



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA MECÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

RAYANA PRISCILLA SILVA PONTES

**SÍNTESE E IMOBILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE FIBROÍNA EM
SUBSTRATO TÊXTIL: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ADESÃO CELULAR.**

Natal-RN

2018

SÍNTESE E IMOBILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE FIBROÍNA EM SUBSTRATO TÊXTIL: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ADESÃO CELULAR.

RAYANA PRISCILLA SILVA PONTES

Dissertação apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica – PPGEM, pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica. Área de concentração: Tecnologia dos Materiais.

Orientador:

Prof. Dr. Rasiah Ladchumananandasivam

Co-Orientador:

Prof. Dr. José Heriberto Oliveira Nascimento

Natal – RN

2018

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Central Zila Mamede

Pontes, Rayana Priscilla Silva.

Síntese e imobilização de nanopartículas de fibroína em substrato têxtil: avaliação da citotoxicidade e adesão celular / Rayana Priscilla Silva Pontes. - 2018.

76 f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Tecnologia, Programa de Pós Graduação em Engenharia Mecânica. Natal, RN, 2018.

Orientador: Prof. Dr. Rasiyah Ladchumananandasivam.

Coorientador: Prof. Dr. José Heriberto Oliveira Nascimento.

1. Nanobiotecnologia - Dissertação. 2. Biomaterial - Dissertação. 3. Nanopartículas de fibroína - Dissertação. 4. Biotêxteis - Dissertação. I. Ladchumananandasivam, Rasiyah. II. Nascimento, José Heriberto Oliveira. III. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 620.3+677.014.5

**SÍNTESE E IMOBILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE FIBROÍNA NO
SUBSTRATO TÊXTIL: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ADESÃO
CELULAR.**

RAYANA PRISCILLA SILVA PONTES

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rasiah Ladchumananandasivam – UFRN - Presidente

Prof. Dr. José Heriberto O. Nascimento – UFRN (Co-Orientador)

Dra. Késia Karina de Oliveira Souto Silva – UFRN (Examinador Interno)

Dra. Elisângela Bezerra das Neves Holanda - (Examinador Externo)

Dra. Andrea Lima de Sá – UES/RN (Examinador Externo)

Natal – RN

2018

Dedico este trabalho aos meus pais, por me incentivarem a sempre buscar mais conhecimento, estudo e dedicação.

Aos meus orientadores e professores, que ao longo do caminho me ajudaram compartilhando seus ensinamentos para me aprimorar.

Aos amigos que direta e indiretamente colaboraram no dia a dia para a realização de mais uma etapa.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde, força e oportunidade para superar os desafios e dificuldades.

Aos meus pais e familiares, pelo grande apoio e carinho extremamente necessários para me fortalecer nessa exaustiva jornada.

Ao Prof. Dr. Rasiah Ladchumananandasivam pela confiança, orientação, paciência, ensinamentos, total incentivo desde a graduação e pela contribuição na minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. José Heriberto O. Nascimento pela orientação, paciência, amizade e valiosa colaboração para o desenvolvimento deste projeto.

A Dra. Elisângela Bezerra das Neves Holanda e Dra. Andrea Lima de Sá, por aceitarem o convite para participar da banca de defesa e pela colaboração ao trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da UFRN e ao Departamento de Engenharia Têxtil da UFRN, pela estrutura física e suporte profissional.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da UFRN, pelo conhecimento compartilhado ao longo do curso.

Aos professores e funcionários técnicos do Departamento de Têxtil da UFRN, pela contribuição científica.

Aos Laboratórios de Física da UFRN; Engenharia de Materiais da UFRN; Instituto de Química da UFRN; Engenharia Química da UFRN; Centro de Bioquímica da UFRN e a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Agradeço também a todos os amigos da família PQNTF - LABTEX, professores pesquisadores, alunos de iniciação científica, alunos da pós-graduação pelo acolhimento, parceria, amizade, discussões científicas e momentos de descontração.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela bolsa de estudo concedida.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*"A ciência, como um todo, não é nada mais
do que um refinamento do pensar diário."*

Albert Einstein

RESUMO

Estudos recentes têm demonstrado o crescente interesse em pesquisar novos materiais em nanoescala, uma vez que abrange diversas áreas com enormes possibilidades de aplicações. O foco na área têxtil é o desenvolvimento de materiais multifuncionais, como têxteis biocompatíveis e biodegradáveis aplicados na área biomédica. Entretanto para que um material consiga exercer essa função, é necessário que ele não apresente citotoxicidade e possa ser degradado sem lançar no organismo humano possíveis toxinas. Dentre esses, a fibroína, um biomaterial bastante versátil presente no casulo do bicho da seda, *Bombyx mori*, vêm sendo constantemente, estudado por apresentar uma excelente capacidade de sofrer mudanças na sua conformação, podendo se tornar uma partícula nanométrica de formato esférico.

Esta dissertação de mestrado desenvolvido apresenta uma solução viável para produção de nanopartícula de fibroína, por meio de uma metodologia em sistema ternário. A síntese foi efetuada e as amostras obtidas foram caracterizadas por Potencial Zeta (via Nanosizer), Difractometria de Raios X (DRX), determinação de área específica Total pelo método BET (Brunauer, Emmett e Teller), Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier com Reflectância Difusa Atenuada (FTIR/ATR), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Em seguida, as nanopartículas de fibroína foram imobilizadas em malha de PLA e funcionalizadas com quitosana para análises de FTIR e DRX. Análise da citotoxicidade com o ensaio colorimétrico (MTT) e adesão celular. Os resultados de DLS, FTIR e MET comprovam a formação das nanopartículas de fibroína de seda esféricas com tamanhos médios entre 48 a 156 nm, e o potencial zeta de $-19,95\Omega$ o que caracteriza um material com estabilidade coloidal. A avaliação da viabilidade celular mostrou as NPF's como material não citotóxico para baixas concentrações, confirmando que o método de obtenção das nanopartículas por sistema ternário é uma alternativa eficaz e de custo baixo onde apresenta um grande potencial para utilização como biomaterial, devido à sua baixa biocompatibilidade.

Palavras-chave: Nanobiotecnologia. Biomaterial. Citotoxicidade. Fibroína. Nanopartículas. Biotêxteis. Adesão celular.

ABSTRACT

Recent studies have demonstrated that there is an increase in the research interest on new nanoscale materials, as they are being used in diversified areas with enormous possibilities of applications. The main focus in the textile area is the development of multifunctional materials to be used as antimicrobials in the biomedical area. Even though, a material to exercise its function, it is necessary to certify that the product is nontoxic and can be degraded in the human organism without delivering any possible toxins. Within this context, fibroin, which is a biomaterial and highly versatile and is present in the silk cocoons (*Bombyx mori*), is being constantly studied for its excellent capacity to adapt to changes, and can transform into spherical nanometric particles.

The present dissertation proposes to present a viable solution in the production of fibroin nanoparticles, through a methodology of ternary diagram. After the synthesis, the samples were characterised for their particle size and zeta potential (using Nanosizer), x-Ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflectance (FTIR-ATR). The fibroin nanoparticles and PLA were immobilised on a soya knit fabric, which was functionalized with chitosan. These were analysed using FTIR and cytotoxicity tests were carried out through the Evaluation of Direct Calorimetric (MTT) assay and cellular adhesion. The evaluation of cell viability showed the NPF's as a non-cytotoxic material at low concentrations, confirming that the method of obtaining the nanoparticles by ternary system is an effective and low cost alternative where it presents a great potential for use as biomaterial due to its mechanical resistance, biocompatibility and biodegradability. The results from the DLA and FTIR tests showed the formation of silk fibroin nanoparticles with measurements between 48 and 156 nm and the value of the zeta-potential was -19.95Ω . The evaluation of cell viability showed the NPF's as a non-cytotoxic material at low concentrations, confirming that the method of obtaining the nanoparticles by ternary system is an effective and low cost alternative where it presents a great potential for use as biomaterial due to its mechanical resistance, biocompatibility and biodegradability.

Keywords: Nanobiomaterials. Biomaterial. Silk Fibroin. Nanoparticles. Medical textiles. Cytotoxicity, Adhesion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Representação escala nanométricas	20
Figura 02 – Aplicações nanotecnológicas.	21
Figura 03 – Camisa com ação bacteriostática.....	22
Figura 04 – a) Bicho da seda b) Diagrama esquemático da fibroína de seda	25
Figura 05 – Sequência de aminoácido da SF.....	26
Figura 06 – Conformações a) α -hélice e b) β -folha de fibroína	27
Figura 07 – Exemplos de formas de obtenção da SF.....	28
Figura 08 – Estrutura básica da quitina e quitosana. Se $m \geq 40\%$ será quitosana; se $m < 40\%$ será quitina	29
Figura 09 - Classificação das fibras têxteis	30
Figura 10 – Fibra derivadas do PLA	31
Figura 11 – Exemplos de têxteis médicos	32
Figura 12 – Fluxograma 1 de processo experimental realizado na 1ª etapa	36
Figura 13 – Fluxograma 2 de processo experimental realizado na 2ª etapa.....	37
Figura 14 – Casulo espécie <i>Bombyx mori</i>	37
Figura 15 – Fluxograma da síntese de NPF's	39
Figura 16 – Casulos cortados.....	40
Figura 17 – Fibroína livre de sericina	40
Figura 18 – Solução após dissolução da SF	41
Figura 19 – Diálise.....	41
Figura 20 – Fibroína solubilizada.....	41
Figura 21 – Solução de NPSF	42
Figura 22 – NPSF liofilizada	42
Figura 23 – Máquina de malha	43
Figura 24 – Fabricação de malha	43
Figura 25 – Malha de PLA alvejada.....	44
Figura 26 – Equipamento Zeta Plus.	45
Figura 27 – Isoterma (n versus P/P_0) do tipo I ao tipo VI	49
Figura 28 – Gráfico DLS das NPSF com variação de tempo a) NPSF 2h b) NPSF 4h c) NPSF 6h.....	54
Figura 29 – FTIR das NPSF	57

Figura 30 – FTIR das NPSF na malha de PLA.....	58
Figura 31 – DRX das NPSF.....	59
Figura 32 – DRX das NPSF na malha de PLA	60
Figura 33 – Imagem via MET da NPF's com 0,2 μ m	61
Figura 34 – A – malha PLA, B – NPF's, C – malha de PLA funcionalizado com as NPF's e D – malha PLA modificado com quitosana	62
Figura 35 – Micrografia da malha de PLA + quitosana + NPF's a 2 μ m	63
Figura 36 – Micrografia da malha de PLA + quitosana + NPF's a 1 μ m	63
Figura 37 - Isoterma de adsorção/dessorção de N ₂ na nanopartícula de fibroína....	65
Figura 38 – Resultados dos ensaios de citotoxicidade para diferentes concentrações de NPF's	66
Figura 39 – Interação de RAW com fibroína a) após 24h b) após 48h c) após 72h.	67
Figura 40 – Fotomicrografia da interação de células RAW com NPF's em 72h a) PLA b) PLANPF c) PLAQNPF d) PLAQ, respectivamente. Aumento de 400x.....	69
Figura 41 – Fotomicrografia indicando efeito diferente a) meio da malha de PLA com NPF's b) extremidade de malha de PLA com NPF's.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Composição dos casulos do bicho da seda <i>Bombyx mori</i>	25
Tabela 02 – Receita para dissolução de SF	40
Tabela 03 – Classificação dos poros segundo seu diâmetro	49
Tabela 04 – DLS das NPSF com variação de tempo.....	53
Tabela 05 – Gráfico DLS das NPSF com variação de tempo de 6h	55
Tabela 06 – Principais grupos observados no espectro FTIR das NPSF	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALA	Alanina
DEMat	Departamento de Engenharia de Materiais
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DRX	Difração de Raios X
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GLY	Glicina
LABMAT	Laboratório de Biologia da Matéria e Toxoplasmose
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MTT	Método Direto
NP	Nanopartícula
NPF's	Nanopartículas de Fibroína de Seda
NSF	National Science Foundation
NT	Nanotecnologia
NUPEQ	Núcleo de Pesquisas de Engenharia Química
PLA	Poliácido Láctico
PLAQ	PLA funcionalizado com quitosana
PLANPF's	PLA com nanopartículas de fibroína
PLAQNPF	PLA com nanopartículas de fibroína e quitosana
SER	Sericina
SF	Fibroína de Seda
SSF	Solução de Fibroína de Seda
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVOS GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 NANOTECNOLOGIA	19
3.1.2 Nanotecnologia Têxtil	21
3.2 BIOMATERIAIS	23
3.2.1 Fibroína de Seda (SF)	24
3.2.2 Aplicações da Fibroína de Seda	27
3.2.3 Quitosana	29
3.3 FIBRAS TÊXTEIS	30
3.3.1 Fibras de milho políácido láctico (PLA)	31
3.3.2 Fibras utilizadas em aplicações médicas	31
3.4 CITOTOXICIDADE E ADESÃO	34
3.4.1 Citotoxicidade	34
3.4.2 Adesão Celular	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 FLUXOGRAMA DOS PROCESSOS	36
4.2 CASULO DO BICHO DA SEDA	37
4.3 MATERIAIS QUÍMICOS E EQUIPAMENTOS	37
4.3.1 Procedimentos Experimentais	38
4.3.1.1 Síntese das Nanopartículas de Fibroína	38
4.3.1.1.1 Extração de Sericina	39
4.3.1.1.2 Dissolução da Fibroína	40
4.3.1.1.3 Isolamento das Nanopartículas	42

4.3.2.1	Preparação dos Substratos Têxteis	42
4.3.2	Técnicas de Caracterização	44
4.3.2.1	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	44
4.3.2.2	Potencial Zeta	44
4.3.2.3	Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	45
4.3.2.4	Difração de Raios X (DRX)	45
4.3.2.5	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	47
4.3.2.6	Microscopia Eletrônica de Varrimento com Emissão de Campo (MEV-FEG)	47
4.3.2.7	Determinação de área específica pelo método BET	48
4.3.2.8	Citotoxicidade	50
4.3.2.9	Ensaio de Adesão Celular	51
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
5.1	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	53
5.2	Potencial Zeta	55
5.3	Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier (FT-IR)	56
5.4	Difração de Raios X (DRX)	58
5.5	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	60
5.6	Microscopia Eletrônica de Varrimento com Emissão de Campo (MEV-FEG)	61
5.7	Determinação de área específica pelo método BET	64
5.8	Citotoxicidade	66
5.9	Ensaio de Adesão Celular	68
6.	CONCLUSÃO	71
7.	REFERÊNCIAS	72

1. INTRODUÇÃO

A palavra nanotecnologia refere-se a uma medida, a um tamanho. Não é um objeto. Um nanômetro (nm) é uma bilionésima parte de um metro, ou uma milionésima parte de um milímetro (ABDI, 2011). A chamada nanotecnologia é um termo abrangente que engloba muitas áreas de pesquisa e de manipulação de objetos medidos em nanômetros. É, na verdade, um conjunto de conhecimentos e de tecnologias – as nanotecnologias (PEREZ, 2009). Atualmente, graças a esta tecnologia podem ser construídas estruturas com dimensões menores que 100 nanômetros (1 nanômetro = 10^{-9} metros) (ALVES, 2004). Hoje, está claro que as Nanotecnologias têm, como uma de suas características, a de cruzar as fronteiras da química, física, ciências biológicas, engenharias e tecnologias (PEREZ, 2009).

Estruturas nanométricas vem sendo largamente utilizados nas áreas têxteis, eletrônicos, agricultura, ciências forenses, espaciais, medicas. Materiais poliméricos são usados para fabricar nanopartículas em virtude de suas propriedades sinérgicas e híbridas derivadas de vários componentes (SUBIA; KUNDU, 2013). Entre as novas formulações farmacológicas temos as nanopartículas, que por apresentarem tamanho nanométrico e forma esférica tem facilidade na entrega de drogas terapêuticas (ALBANESE *et al.*, 2012).

Uma crescente vertente na aplicação da nanotecnologia se encontra na área têxtil, pela grande versatilidade têxtil podemos encontrar essa nova tecnologia no vestuário, geotêxtil, ecotêxtil, militartêxtil, medtêxtil, entre outros. Durante o processamento de fibras ou tecidos, estes, são sujeitos a várias técnicas de acabamento para lhes conceder diversas propriedades (GIRI, *et al.*, 2006).

Uma questão fundamental no desenvolvimento de produtos têxteis para fins médicos, reside na sua compatibilidade e toxicidade. Para que uma nanopartícula funcione corretamente como carregador farmacológico, por exemplo, é necessário que esta seja feita de um substrato que seja biocompatível e biodegradável, não levando a reações adversas quando administrada no organismo. Dentre esses biomateriais a fibroína, uma macromolécula proteica, recebe lugar de destaque pois apresenta propriedades não imunogênicas (LOZANO-PEREZ *et al.*, 2015).

A fibroína, uma proteína encontrada no casulo do bicho da seda (WENG *et al.*, 2015), vem sendo largamente estudada para fins biomédicos, podendo ser substrato

para nanopartículas, filmes, hidrogéis, scaffolds e nanofibras (NAM *et al.*, 2001) (SHARMAR *et al.*, 2016) e isso se deve pelas propriedades conferidas como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, apresentar uma estabilidade morfológica, propriedades mecânicas, ser não trombogênico, e ter bioadesividade celular (CHOUDHURY *et al.*, 2016).

Tal polímero constitui, junto com a sericina, o casulo do bicho da seda. A sericina composta basicamente de região amorfa é uma região “like glue” que é responsável por unir as fibras de fibroína (KUNDUN *et al.*, 2008). Já essa é composta por cerca de 5507 aminoácidos (LOZANO-PEREZ *et al.*, 2015) que corresponde a cerca de 70 a 80% do casulo e é formada por três subunidades: uma cadeia leve (~26kDa), uma cadeia pesada (~325kDa) ambas unidas por pontes dissulfeto, e uma glicoproteína P25 que se une as outras duas ligações hidrofóbicas (CAO *et al.*, 2014) (MATHUR *et al.*, 2010).

O principal objetivo neste trabalho é produzir nanopartículas derivadas da fibroína e caracterizá-las. Para a obtenção das NPF foi utilizado como matéria prima o casulo do bicho da seda tipo I, espécie *Bombyx mori* seguido da extração de sericina onde ocorre a fase da degumentação por solução a 0,5% de Carbonato de Sódio (Na_2CO_3). Para solubilização utilizamos um sistema ternário composto de Etanol-Água-Cloreto de cálcio e finalizando com o isolamento das partículas.

Para caracterização das nanopartículas foram realizados os ensaios Difração de Raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Determinação de área específica pelo método BET, Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (FTIR), Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta. Por fim, ensaio de citotoxicidade e ensaio de adesão celular via método MTT para avaliar o efeito citotóxico do material funcionalizado.

Neste trabalho testou-se a funcionalização na malha de PLA com as nanopartículas de fibroína e também funcionalizadas com quitosana, para obtenção de um efeito bioativo antimicrobiano, com potencial aplicação em materiais têxteis biomédicos, geriátricos e pediátricos. Numa primeira abordagem, testou-se a capacidade de ação antibacteriana com a detecção da concentração mínima toxicológica do material funcionalizados. de forma a garantir o desenvolvimento eficaz

e seguro de um novo método/material antibacteriano utilizando os ensaios de MTT e adesão celular com células RAW.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAL

O presente trabalho tem como objetivo a produção de nanopartículas de fibroína, extraídas a partir do casulo do bicho da seda, de métodos rápidos e de baixo custo, sendo nosso produto analisado a partir de parâmetros e avaliar sua potencialidade de material biocompatível, para uso têxtil biomédicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extração da fibroína da seda a partir de casulos de bicho-da-seda domesticado tipo I (*Bombyx mori*);
- Obtenção da solução de fibroína;
- Sintetizar as nanopartículas de fibroína por uma rota básica com parâmetros controlados para se obter nanoestruturas poliméricas esféricas;
- Caracterizar sua nanoestrutura utilizando parâmetros como Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta, Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raio-x (DRX), Determinação de área específica pelo método de BET, Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET);
- Imobilizar as nanopartículas na malha de PLA;
- Funcionalizar a malha de PLA com quitosana para obter um comparativo de melhor performance;
- Caracterizar a malha de PLA funcionalizado por Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raio-x (DRX);
- Realizar análise de citotoxicidade e adesão celular pelo método MTT.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No Capítulo 3 são apresentadas a revisão da literatura e a fundamentação teórica, com um breve estudo histórico com destaque para nanotecnologia têxtil, os métodos de síntese de nanopartículas de fibroína, as suas características estruturais e suas aplicações em substratos têxteis direcionados para utilização médica.

3.1 NANOTECNOLOGIA

A constante busca por novos conhecimentos e a necessidade de dominar novas tecnologias, fundamentais para enfrentar a acirrada competição num mercado globalizado, estão rapidamente impelindo a humanidade para a próxima revolução tecnológica. Esta deve se basear no domínio dos materiais em escala nano, ou seja, a região entre o universo dos átomos e das moléculas e o universo que denominamos de macroscópico (maior que cerca de 1 μm) (ARAKI, 2007).

Segundo Roco (2001) da (National Science Foundation - NSF), O nanômetro (um bilionésimo do metro) é um ponto mágico na escala dimensional. As nanoestruturas são a confluência do menor dispositivo feito pelo homem e a maior molécula das coisas vivas. A ciência e a engenharia da nanoescala referem-se aqui ao entendimento básico e aos resultados dos avanços tecnológicos, oriundos da exploração das novas propriedades físicas, químicas e biológicas dos sistemas que apresentam tamanho intermediário entre os átomos isolados, moléculas e materiais estendidos (bulk), no qual (tamanho) as propriedades de transição entre estes dois limites podem ser controladas.

Nesse contexto estão sendo preparados diversos tipos de nanomateriais como nanopartículas (PARK, 2007) nanofios (BRUNO, 2007), nanocompósitos, materiais nanoestruturados, nanoligas, nanotubos etc., que devem provocar um grande impacto científico e tecnológico, principalmente tendo em vista suas excepcionais propriedades elétricas, mecânicas, ópticas, magnéticas e de transporte (ARAKI, 2007).

Figura 01- Representação escala nanométrica

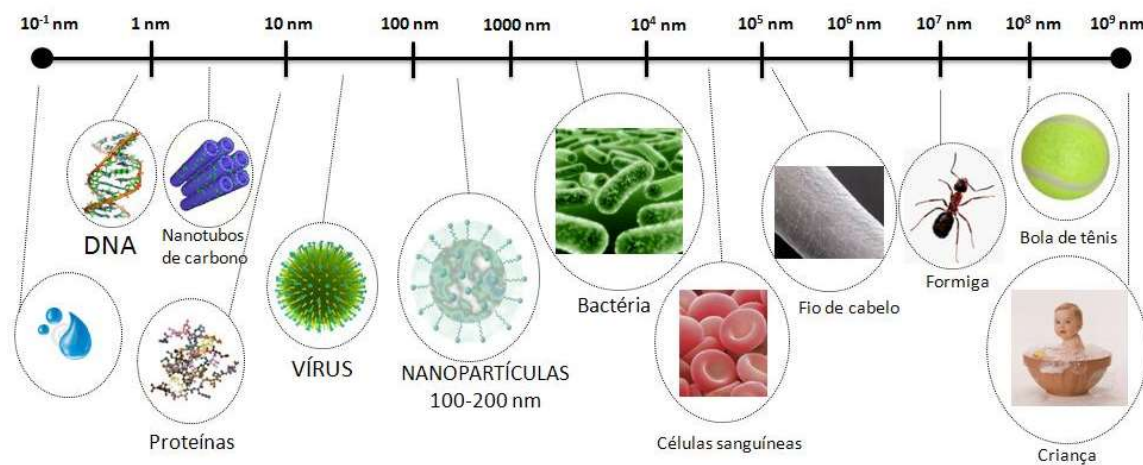


Figura: Cândice Felippi

Fonte: CANDICE, 2017.

No século XX, as invenções mais relevantes foram a tecnologia nuclear, os aviões supersônicos, a internet e o telefone celular. A nanotecnologia é a ciência do século 21. Espera-se ver grandes avanços nas seguintes áreas: nanoeletrônica, tecnologia nanomolecular, microscópios de resolução em nanoescala, conceitos biológicos, medicina e saúde, energia, indústria automóvel e tecnologia têxtil. As nanotecnologias estão se desenvolvendo rapidamente, apresentando grande potencial, tanto para melhorar a qualidade da vida humana como para criar riqueza por meio de processos novos e sustentáveis, baseados no conhecimento (TIAGO, 2009).

Existem inúmeras aplicações relacionadas com a Nanotecnologia como podemos verificar na figura 2 abaixo.

Figura 2 - Aplicações da nanotecnologia



Fonte: adaptado ZANONI, 2016

A metodologia de fabricação dos nanomateriais podem ser feitas pelo método “*Top- Down*” e “*Bottom-Up*”. O que difere uma da outra é devido à forma de obtenção. A metodologia “*Top- Down*”, é devido a miniaturização de sistemas eu antes estavam em escala macro, ou seja, trabalha-se do maior para o menor, com a desvantagem de perda de material durante a operação. Na metodologia “*Bottom-Up*”, desenvolve do pequeno para o grande, ou seja, trabalha-se com moléculas e átomos por meio de processos de montagem, partículas maiores que os iniciais são criados, tendo como vantagem nenhuma perda de material (NASCIMENTO, 2012; LOOS, 2014; SILVA, 2014).

3.1.2 Nanotecnologia Têxtil

A nanotecnologia consiste em um importante segmento do setor têxtil, pois dá novas características a fibras, fios e tecidos, além de ser um mercado significativo e crescente. Aplicada ao setor têxtil se divide em: as nano-fibras e fibras contendo nano

partículas, e, acabamento/ revestimentos contendo nano substâncias (MARTINEZ *et al.*, 2014).

A relação entre a nanotecnologia e a indústria têxtil começou com o desenvolvimento da microfibras, desde então o uso da nanotecnologia nesta área só vem crescendo. As duas vertentes principais do uso dessa tecnologia no setor têxtil são no desenvolvimento de fibras, as quais foram nomeadas nano-fibras, e na etapa do beneficiamento têxtil, agregando acabamentos funcionais aos têxteis (TORRES; RAMOS, 2014).

O uso de nanotecnologia nesse setor permite a produção de materiais com funções especiais (EUFINGER, 2009) como antibactericida à base de prata, minúsculas cápsulas de agentes hidratantes, desodorizantes, repelentes de insetos e antirrugas, antichamas e de fácil lavagem em baixas temperaturas (ALMEIDA, 2010). Sem a nanotecnologia não seriam possíveis tais aplicações pois estas ficam entre as fibras dos tecidos.

Para Ferreira *et al.*, (2014), o usual recorre-se atualmente a tecnologias que consigam complementar as lacunas das fibras convencionais. Em um caso ideal, a própria fibra deverá ser capaz de tais funções. Os avanços nas tecnologias de ponta e em particular da nanotecnologia, permitem vislumbrar a evolução pretendida nos materiais fibrosos.

Na figura 3 podemos ver roupas com efeito da nanotecnologia: acrescenta funções aos tecidos. Estes podem-se tornar bacteriostáticos, repelentes a insetos ou impermeáveis. Como funciona: as nanopartículas são adicionadas às fibras durante a fabricação do tecido. Nessas partículas ficam as substâncias carregadas das diferentes propriedades.

Figura 03 – Camisa com ação bacteriostática



Fonte: TIAGO, 2009

Durante o processamento de fibras ou tecidos, estes, são sujeitos a várias técnicas de acabamento para lhes conceder propriedades antimicrobianas. Essas propriedades não se destinam exclusivamente para proteção do usuário contra bactérias, fungos e outros microrganismos, mas também em aumentar a própria resistência da fibra ao ataque bacteriano, como, por exemplo, biodeterioração causada por fungos, sem prejudicar as restantes características da fibra (GIRI *et al.*, 2009).

3.2 BIOMATERIAIS

Um biomaterial é uma substância que foi projetada de forma que, sozinha ou como parte de um sistema complexo, é usada para direcionar, pelo controle das interações com os componentes dos sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico, na medicina humana ou veterinária (VALLES RAMÍREZ, 2016). Biomateriais são destinados a possuir uma interface com os sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo. (GIL; FERRERIA, 2006).

Utilizados em dispositivos médicos de forma temporária ou permanentemente implantado no corpo humano, o termo biomaterial foi definido como qualquer material não vivo utilizado em medicina, com o propósito de interagir com um sistema vivo. Este conceito é complementado com a definição de biocompatibilidade, que é a capacidade de o material desempenhar sua função com uma resposta apropriada do tecido hospedeiro (TURRER; FERREIRA, 2008; VALLES RAMÍREZ, 2016).

Um desafio na área de pesquisa de novos biomateriais é o desenvolvimento destes a partir de matérias-primas de baixo custo e fácil acesso. Para isso é necessário destacar as propriedades biológicas, como a biocompatibilidade, que de certa forma está associada à hemocompatibilidade, citotoxicidade, alergenicidade, estimulação de adesão e proliferação celular; as propriedades físicas, como morfologia da superfície, energia superficial, encaixe anatômico, rugosidade, porosidade, cor, transparência e permeabilidade, propriedades mecânicas como tensão de ruptura, alongamento e flexibilidade e propriedades químicas, como densidade, estabilidade, resistência à esterilização e forma de degradação quando em contato com o organismo (RATNER *et al.*, 2013).

As principais classes de materiais utilizados para a produção de biomateriais são: as cerâmicas, os metais e os principalmente os polímeros pois apresentam os maiores potenciais para aplicações biomédicas (CARRETERO, 2013; MATSUI, 2007). Os tipos de materiais podem ser classificados quanto a natureza química:

- Naturais, como por exemplo, o colágeno, a seda, a queratina; a quitosana, fibroína, sericina, e etc.
- Sintéticos, tais como, as cerâmicas, os polímeros sintéticos, os metais e ligas metálicas, os nanotubos de carbono e os materiais compósitos.

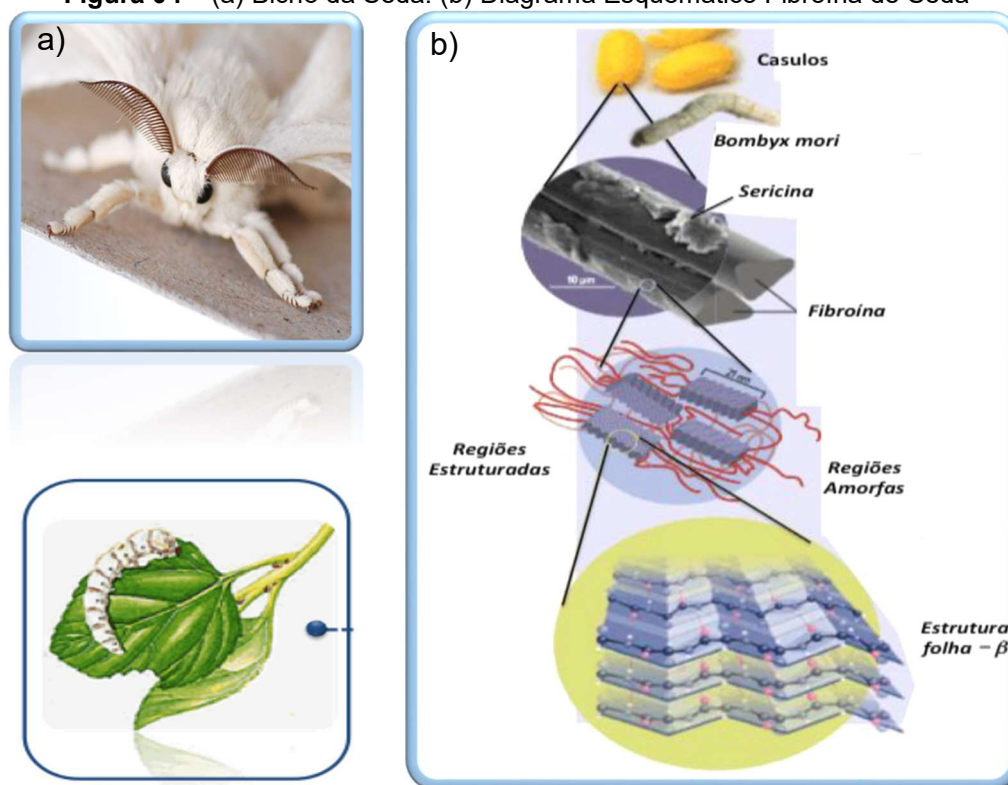
3.2.1 Fibroína de Seda (SF)

As fibras de sedas são produzidas por bicho-da-seda, aranhas, escorpiões, ácaros e moscas, e são diferentes em componentes, estrutura e propriedades de acordo com a fonte específica (MÜLLER, 2014; ALTMAN *et al.*, 2003). A espécie *Bombyx mori* popularmente conhecida como bicho-da-seda, trata-se da espécie mais utilizada pela indústria têxtil (BEXIGA, 2014).

A seda produzida pelo bicho-da-seda, (figura 04) tem ótimas propriedades mecânicas além de estabilidade térmica e química, flexibilidade morfológica, boa permeabilidade ao vapor de água e solventes. É composta por duas proteínas principais: a fibroína e a sericina. A fibroína de seda é o principal constituinte dos casulos fabricados pelo bicho-da-seda. Já a sericina reveste a SF e age como um adesivo e está presente em menor quantidade (MÜLLER, 2014).

A SF derivada da *Bombyx mori* é um biopolímero formado a partir de 5507 aminoácidos e constitui de 70 a 80% da composição do casulo (Tabela 01). A fibroína é constituída basicamente por três aminoácidos, glicina (Gly), alanina (Ala) e serina (Ser), figura 06. Este biopolímero é composto de cadeias leves (25 kDa) e pesadas (350 kDa), que formam regiões cristalinas responsáveis pelas propriedades mecânicas e amorfas que conferem a higroscopicidade das fibras (PAN *et al.*, 2012).

Figura 04 – (a) Bicho da Seda. (b) Diagrama Esquemático Fibroína de Seda



Fonte: LOPES, 2017.

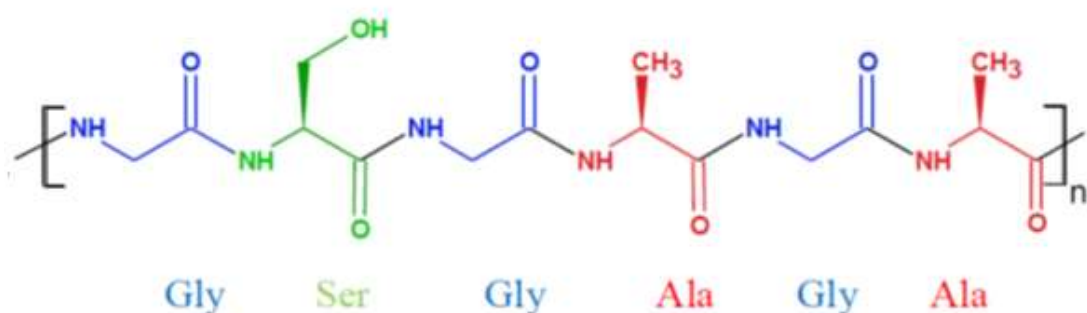
Tabela 01 - Composição dos casulos do bicho-da-seda *Bombyx mori*.

Componente	%
Fibroína	70 – 80
Sericina	20 – 30
Matéria de Cera	0,4 – 0,8
Carboidratos	1,2 – 1,6
Matéria Inorgânica	0,7
Pigmento	0,2
Total	100

Fonte: MONDAL, 2007.

A fibroína é encontrada em 3 estruturas polimórficas diferentes, chamadas seda I, II e III. A estrutura seda I é encontrada em soluções e pode ser facilmente convertida para conformações de β -folha que definem a seda II; a seda III é encontrada em interfaces ar-água. A parte cristalina da SF são longas repetições de glicina e outro aminoácido (Gly-X) e é responsável pelas β folhas anti-paralelas e a parte amorfa são segmentos não repetidos na estrutura da proteína, responsáveis pelas voltas. A parte cristalina da SF é formada majoritariamente pelos resíduos alanina e glicina e em menor número por serinas e tirosinas (GONÇALVES, 2015).

Figura 05 - Sequência de aminoácido da SF

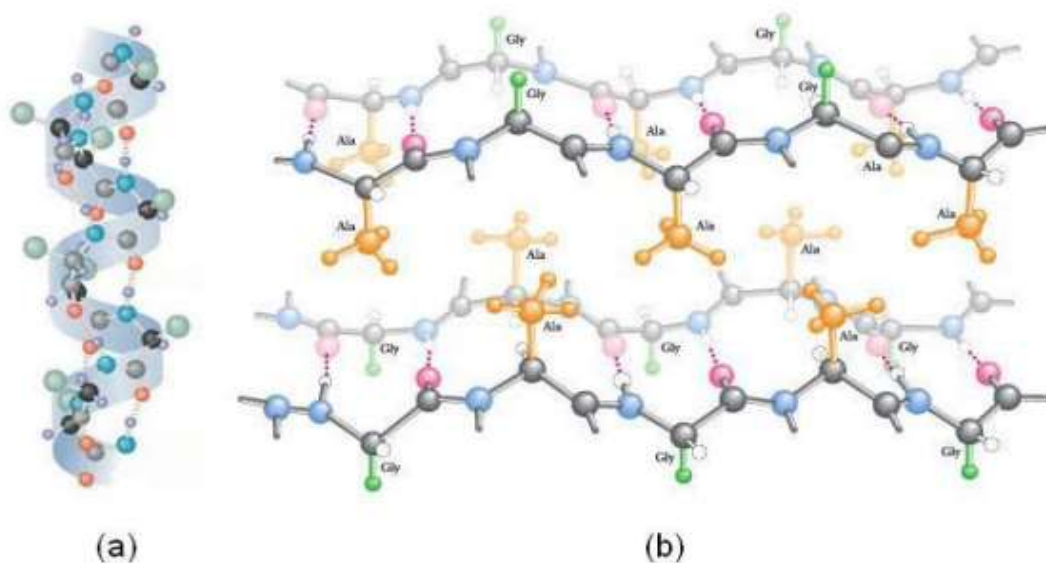


FONTE: GOLÇALVES, 2015.

Para regenerar a FS, é necessário um processo de dissolução para destruir as estruturas cristalinas β -folhas. Dois tipos de solventes são comumente usados para dissolver a FS: soluções aquosas concentradas de sal de lítio e sistema sal-agua-álcool. Em qualquer caso, estes sais (sódio, lítio ou cálcio) devem ser removidos por diálise devido à alta concentração utilizada. Nanofibras de FS podem ser produzidas a partir da fibroína da seda regenerada, solubilizadas em solventes adequados. Porém, o material obtido pode facilmente se dissolver em água. As mantas nanofibrilicas formadas precisam ser tratadas com metanol, voltando a forma cristalina. Isso ocorre devido as mudanças nas ligações de hidrogênio (MÜLLER, 2014).

Na seda I, o polipeptídeo constituído por uma hélice (figura 6a) está orientado para a direita, é mantido por pontes de hidrogênio e apresenta desde a ausência de estrutura secundária até cristais extremamente ordenados. Em contrapartida, a conformação em β -folha (figura 6b) é resultante da formação de pontes de hidrogênio entre dois ou mais polipeptídeos adjacentes, resultando em uma estrutura termodinamicamente estável (BEXIGA, 2014).

Figura 6 - Conformações (a) α hélice e (b) β -folha da fibroína



Fonte: BEXIGA, 2014.

O processamento dos casulos de fibroína de seda em laboratório inicia-se com o processo de remoção da sericina, também chamado de desegomagem à qual são atribuídos os problemas de biocompatibilidade (ALTMAN *et al.*, 2003). Com o objetivo de solubilizar os fios de fibroína de seda é feita a dispersão dos fios, geralmente com o uso de soluções salinas concentradas na presença de solventes orgânicos. Assim, tanto a desegomagem quanto a dispersão são etapas críticas na elaboração de nanopartículas e filmes de fibroína, que poderiam influenciar as características do produto final. Por fim, a dispersão salina de fibroína é dialisada com o objetivo de retirar os íons presentes na solução e obter uma solução aquosa com a qual são preparados os materiais derivados da fibroína, como filmes, géis, nanopartículas, entre outros (VALLES RAMÍREZ, 2016)

3.2.2 Aplicações da Fibroína de Seda

Sedas são definidas como proteínas poliméricas. Devido essa proteína apresentar características, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa antigenicidade e propriedades mecânicas diferenciadas, atualmente diversas aplicações de fibroína de seda estão sendo largamente investigadas na área médica.

Na década de 90, foi verificado que a fibroína apresenta propriedades especiais para possíveis aplicações em alimentos, cosméticos, materiais para imobilização enzimática, meio de cultura celular, biosensor, músculo e pele artificial, membranas permeáveis e liberação controlada de fármacos. Em virtude dessas aplicações, a fibroína atraiu um grande interesse em muitos campos da ciência e tecnologia, por exemplo, polímeros, biologia, medicina, materiais, engenharia química e sericultura, etc., (LOPES, 2017).

Para a Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA), a SF derivada do casulo do bicho da seda é aprovada como produto para diversas aplicações biomédicas como engenharia dos tecidos, entrega de drogas “*drug delivery*”, medicina regenerativa, tratamentos de feridas e curativos.

Uma vez obtida, a solução de fibroína pode ser processada de formas variadas para obtenção de filmes, hidrogéis, nanopartículas, membranas ou misturas com outros polímeros, incluindo modificações superficiais e funcionalizações (BEXIGA, 2014). Na figura 07, temos exemplos das formas de obtenção.



Fonte: adaptado de KOH *et al.*, 2015.

ALTMAN *et al.*, (2003) descreve os benefícios da SF para aplicações biomédicas pelos seguintes motivos:

- Propriedade mecânica da seda que é superior a qualquer outra fibra natural;
- É uma fibra natural longa com uma considerável história de uso em aplicações médicas;

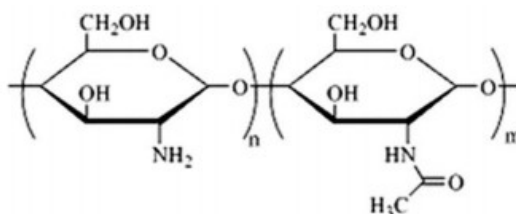
- A capacidade de processar a seda em solução aquosa para posterior formação de filmes, nanopartículas e outros formatos de material, é relativamente simples na solubilização por exposição a álcoois e outros fatores ambientais;
- Simples procedimentos de modificação química em relação às superfícies, tais como adesão ou citocinas, devido à disponibilidade de cadeias laterais de amina e ácido em alguns dos aminoácidos;
- Composição e sequência geneticamente modificadas para características específicas moderadas, tais como peso molecular, cristalinidade e solubilidade;
- Taxa lenta de degradação no caso de *in vitro* e *in vivo*, isso é particularmente útil para *scaffolds* biodegradáveis com crescimento lento do tecido;
- Sem risco de carga biológica.

3.2.3 Quitosana

A quitosana constitui o segundo polímero orgânico natural mais abundante do planeta, ficando atrás apenas da celulose. Ela é um polissacarídeo semissintético de nome poli β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicopirranose) obtida principalmente a partir da quitina. Para TAVARES (2011), a quitosana é conhecida por outros nomes como poliglusam, quitina desacetilada e poli-d-glucosamina. Esse termo quitosana refere-se ao grande número de polímeros.

A quitosana é um polissacarídeo natural com diversas propriedades químicas e biológicas importantes, entre as quais podemos citar hidrofiliabilidade, biocompatibilidade, bioatividade, biodegradabilidade, propriedades policatiónicas, bactericidas, sendo também agente bacteriostático e antimicrobiano, acelera os processos cicatrizantes, é um composto potencialmente modificável, física e quimicamente (MALLMANN, 2010).

Figura 08 – Estrutura básica da quitina e quitosana. Se $m \geq 40\%$ será quitosana; se $m < 40\%$ será quitina.



Fonte: TAVARES, 2011

3.3 FIBRAS TÊXTEIS

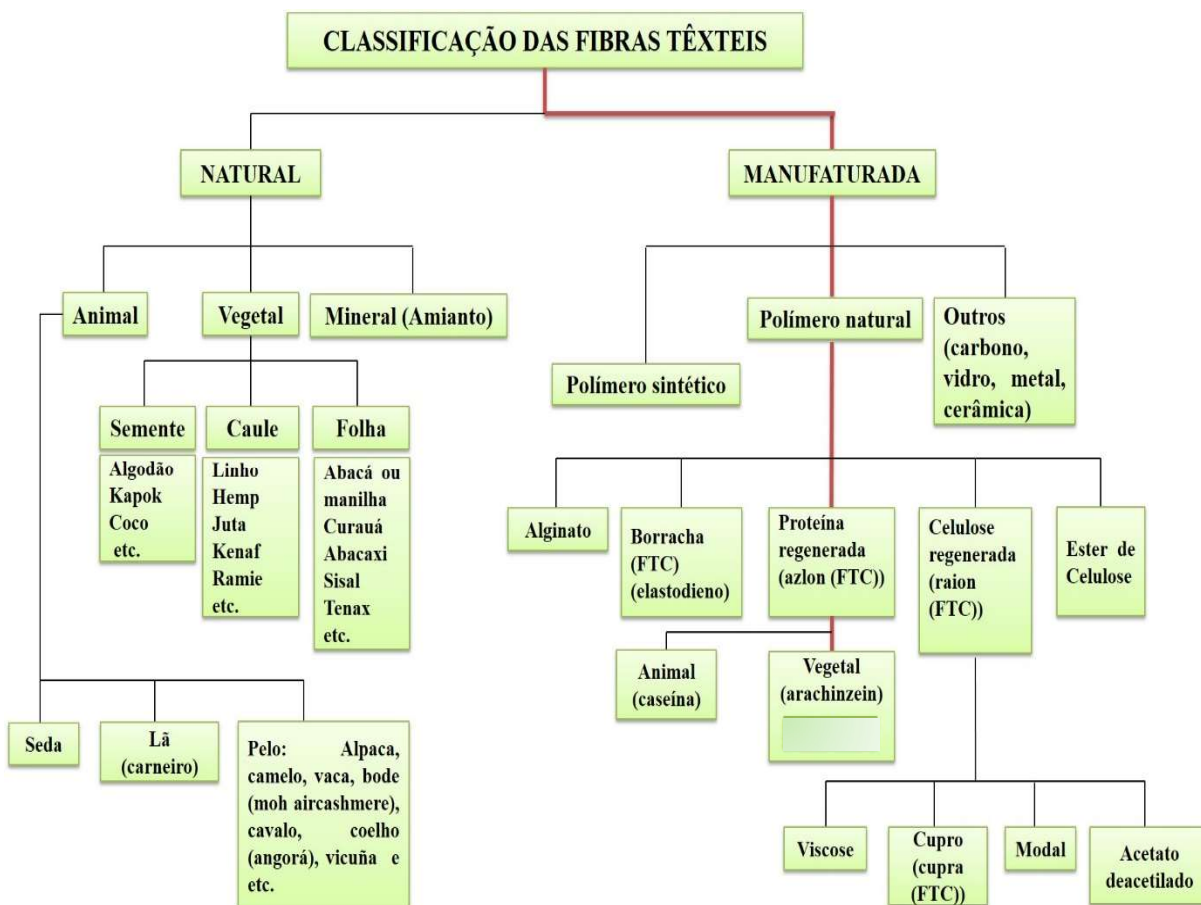
Fibra geralmente é uma matéria-prima têxtil caracterizada pela flexibilidade, finura e alta razão do comprimento para espessura. Todos os fios, sejam naturais ou sintéticos, consistem de um número de fibras ou filamentos (LADCHUMANANANDASIVAM, 2006). Elas podem ser classificadas como natural ou manufaturadas.

Fibra natural: a fibra que ocorre na natureza e que é de origem animal, vegetal ou mineral.

As fibras manufaturadas, são aquelas produzidas a partir de uma matéria-prima natural, através de um processo químico.

A figura 09 mostra a classificação das fibras têxteis divididas em natural e manufaturadas.

Figura 09 – Classificação das fibras têxteis.



Fonte: Adaptado de LADCHUMANANANDASIVAM, 2006.

3.3.1 Fibras de milho poliácido láctico (PLA)

A fibra PLA é obtida a partir de uma matéria vegetal renovável e biodegradável, além destas características, o ácido polilático requer um consumo de combustível inferior a 30-40% para a sua produção e emite menos dióxido de carbono para a atmosfera. Desenvolvida a partir da polimerização do ácido láctico do milho, seu lançamento oficial se deu em janeiro de 2003, onde passou a ser chamado de INGEO (VALLE *et al.*, 2004). A fibra do milho foi apresentada como alternativa às fibras obtidas por síntese química.

Várias companhias têxteis estão experimentando esse tipo de fibra na confecção de roupas e tecidos. A INGEO é considerada uma fibra biodegradável, o que significa que pode ser processada sem emissão de poluentes para o ambiente (MELO, 2009).

A vantagem da fibra de milho (figura 10) é ter alta resistência molecular, UV, as chamas, a proliferação de bactérias e ter baixa toxicidade. Os tecidos obtidos podem ser finos e brilhantes como a seda e espessos e aconchegantes (MELO, 2009), nas propriedades do PLA a absorção, segundo Falcetta (2004), é maior que a dos todos os fios sintéticos convencionais, tais como: poliamida, poliéster e poliacrílicas.

Figura 10 - Fibras derivadas da PLA



Fonte: www.fibre-maxmodel.com/, acesso 2017

3.3.2 Fibras utilizadas em aplicações médicas

O desenvolvimento dos têxteis técnicos vem permitindo a fabricação de novos materiais têxteis para serem utilizados na área médica.

Classificados pela sua área de atuação, podem ser definidos como:

Quadro 1 – Área de atuação têxteis médicos

Têxteis Proteção		Utilizados por profissionais e pacientes para protegê-los de fluidos possivelmente contaminados, como exemplo batas, gorros, mascaras, etc.
Têxteis Cirúrgicos	Implantável	Procedimentos cirúrgicos: suturas, ligamentos artificiais, redes de reforço cirúrgico, etc.
	Não-implantável	Procedimentos cirúrgicos: aplicações externas no corpo humano, como emplastos, gases, etc.
Têxteis Extra corporais		Rins, fígados e pulmões artificiais.

Fonte: adaptado de ANAND, 2000.

Figura 11 – Exemplos de Têxteis médicos



Fonte: <http://dailysoleil.com/>, 2017.

Os materiais fibrosos de utilização em medicina incluem fibras, fios (monofilamento ou multifilamento), estruturas têxteis (tecidos, malhas, entrançados e não-tecidos) e compósitos. Estes materiais podem ser naturais ou sintéticos, biodegradáveis ou não biodegradáveis (RITA *et al.*, 2011). As principais fibras utilizadas em aplicações médicas, bem como as suas principais características, que as tornam indicadas para essas aplicações, encontram-se no Quadro 2 (RAMOS, 2003).

Tal como se mostra no Quadro 2, o algodão e os poliuretanos são dos materiais fibrosos mais requisitados, sendo que a maioria dos materiais fibrosos são utilizados em produtos não implantáveis. Contudo, as aplicações mais interessantes dizem respeito a materiais implantáveis, devido às características e propriedades exigidas ao material fibroso (RITA *et al.*, 2011).

Quadro 2 – Principais fibras utilizadas em aplicações médicas

Fibra	Características	Aplicações
Algodão	Absorvente, flexível, durável, resistente ao uso e toque agradável	Absorventes, ligaduras, emplastros, batas e gorros
Poliuretanos	Elasticidade e recuperação da forma, durabilidade, leveza	Ligaduras, conjuntos de hemodiálise, tubos de oxigenação do sangue, sacos de sangue, tubos de terapia através de gases, aparelhos de assistência do coração e ligamentos
Polipropileno	Esterilização por vapor, baixa absorção de humidade, boa resistência ao impacto	Batas, ligaduras de compressão, suturas
Borracha de Silicone	Estabilidade térmica e oxidativa, boa flexibilidade e elasticidade, compatibilidade com tecidos e com o sangue, inerte e não-tóxico	Tubagens, ampliações mamárias, aplicações vasculares, lentes intra-oculares, cateteres, cirurgia plástica e reconstrutiva, substituição de ossos e cartilagens
Polimetilmetacrilato (PMMA)	Transparência, resistência química a ácidos, rigidez	Dentaduras, reparação de defeitos cranianos, maxilares, fixações vertebrais e implantes
Poliéster	Bom isolamento térmico, ótima resistência mecânica, boa estabilidade dimensional, inerte, flexível, resiliente, pode ser esterilizado por todos os métodos	Próteses, suturas, ligaduras de compressão, batas
Colágeno	Resistência	Suturas
Fibras de Alginato	Eficazes na cicatrização de feridas, não-tóxicas e biodegradáveis	Cicatrização de feridas
Quitina	Não-trombogénica, pode ser absorvida pelo corpo humano, possui uma boa característica de cicatrização	Pele artificial

Fonte: RAMOS, 2013.

Os materiais fibrosos cirúrgicos são todos os materiais fibrosos que são utilizados em cirurgia, podendo-se subdividir em materiais fibrosos não implantáveis e materiais fibrosos implantáveis. Estes materiais devem possuir certas propriedades, de modo a não serem prejudiciais ao paciente, sendo as mais importantes (RITA *et al.*, 2011) (ARMAND, 2010):

- Antialérgicos;
- Anticancerígenos;
- Antibacterianos;
- Biocompatíveis;
- Permeabilidade ao ar;
- Não toxicidade;

- Capacidade de serem esterilizados.

Uma vez que os biomateriais podem ser contaminados com bactérias a possibilidade de esterilização assume grande importância. As técnicas de esterilização podem ser físicas (calor seco, vapor e radiação ionizada) ou químicas. A esterilização não garante, no entanto, a ausência de produtos pirogênicos com bactérias (ARAÚJO *et al.*, 2001) (RAMOS, 2003).

A não-toxicidade não é suficiente para garantir a biocompatibilidade sendo também necessárias bioinatividade e bioaderência. Os parâmetros para teste de biocompatibilidade incluem toxicidade, trombogenicidade, hemólise, teratogenicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade, comportamento e sensibilidade à infecção (ARAÚJO *et al.*, 2001) (RAMOS, 2003).

3.4 CITOTOXICIDADE E ADESÃO

3.4.1 Citotoxicidade

A realização de ensaios de citotoxicidade *in vitro* é essencial na caracterização inicial da biocompatibilidade de biomateriais que visam aplicações médicas. Porém, a sensibilidade dos diferentes ensaios é variável e influenciada por inúmeros fatores, relacionados às próprias condições de ensaio e parâmetros avaliados, assim como à natureza do biomaterial em análise.

Ensaio de citotoxicidade ou viabilidade celular têm o objetivo de testar a atividade citotóxica de vários tipos de compostos, soluções e materiais em diferentes tipos celulares.

De acordo com Wang *et al.*, (2011), a citotoxicidade é a capacidade intrínseca de um material em promover alteração metabólica nas células em cultura, podendo culminar ou não em morte celular.

3.4.2 Adesão Celular

A adesão celular é crucial para a união de células nos tecidos animais. As células simplesmente não “grudam” para formar os tecidos, elas são organizadas em padrões muito diferentes e altamente distintivos. Uma variedade de mecanismos de

adesão celular é responsável pela união das células, juntamente com suas conexões com o citoesqueleto interno (BECCENERI, 2017).

O processo de adesão ocorre através de junções que podem ser divididas em três classes (LI *et al.*, 2012):

a) Junções oclusivas: unem células de um tecido epitelial selando esta camada até a passagem de pequenas moléculas;

b) Junções aderentes: ligam as células a células vizinhas ou à matriz extracelular;

c) Junções comunicantes: fazem a mediação da passagem de sinais elétricos e químicos entre células adjacentes.

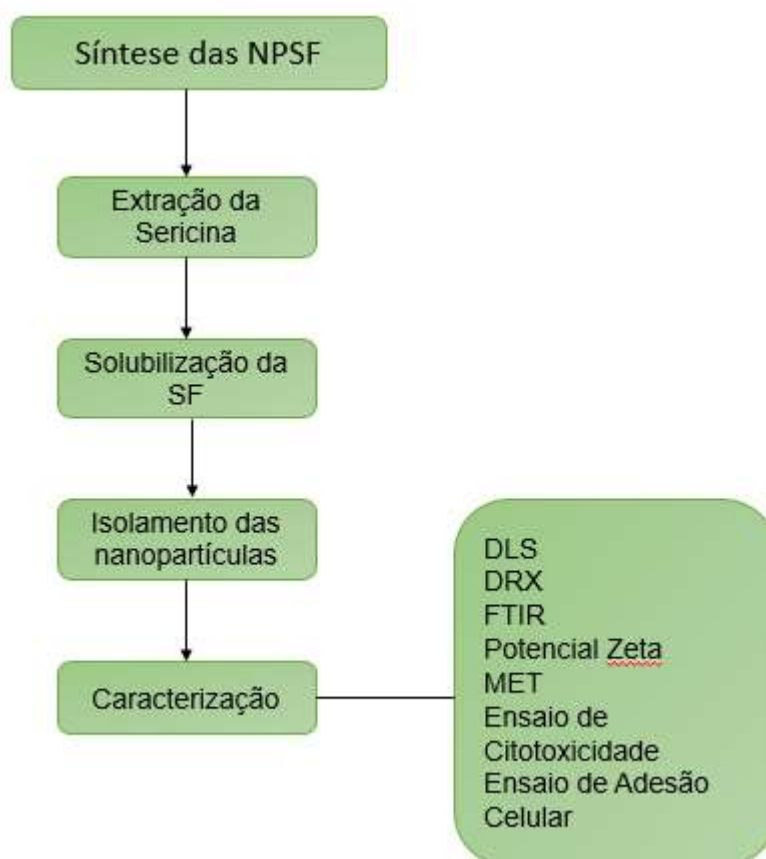
4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo aborda a metodologia aplicada para a realização do processo de síntese das nanopartículas de fibroína e da preparação do substrato têxtil, para posterior imobilização das NPSF no substrato de PLA através da técnica dip coating.

As Figuras 12 e 13 apresentam respectivamente os fluxogramas da primeira e segunda etapa experimental, onde são apresentados os materiais trabalhados na pesquisa, seguido de suas caracterizações.

4.1 FLUXOGRAMA DOS PROCESSOS

Figura 12 - Fluxograma 1 Etapas do Procedimento Experimental realizado na 1ª etapa.



Fonte: AUTOR, 2017.

Figura 13 - Fluxograma 2 Etapas do Procedimento Experimental realizado na 2ª etapa.



Fonte: AUTOR, 2017.

4.2 CASULO DO BICHO DA SEDA

Como matéria prima para a produção das NPSF foi usado casulo do bicho da seda, espécie *Bombyx mori* tipo I cedido pela empresa Bratac do Paraná.

Figura 14 – Casulo espécie *Bombyx mori*.



Fonte: AUTOR, 2017.

4.3 MATERIAIS QUÍMICOS E EQUIPAMENTOS

Os materiais e equipamentos utilizados na pesquisa estão apresentados na Quadro 03 e 04. No Quadro 03 são identificados os reagentes e os equipamentos utilizados para a realização do processo de síntese das nanopartículas de fibroína.

Quadro 03 - Reagentes e equipamentos utilizados na síntese de NPSF.

REAGENTES	FORNECEDOR
Carbonato de Sódio P.A 99% (Na_2CO_3)	Vetec Química Fina LTDA
Cloreto de Cálcio Anidro puríssimo 96% (Ca Cl_2)	Vetec Química Fina LTDA
Álcool Etílico absoluto 99,5% P.A/ACS	NEON Comercial LTDA
Acetona 99,5% P.A/ACS	Anidrol
EQUIPAMENTOS	FORNECEDOR/MODELO
Banho maria	Quimis/Q215M2
Balança analítica digita	Shimadzu/AUY220
Centrífuga micro processada para tubos	Q222TM
Agitador magnético com controle de temperatura e velocidade	Tecnal/TE0853
Agitador magnético	Edutec/EEQ-9008
Estufa secadora	BIOFOCO-BF2 ECF 64
pHmetro	NOVA
Zetasier Nano Series	Mlvem Instruments

Fonte: AUTOR, 2017.

No Quadro 04 são identificados os reagentes e equipamentos utilizados para o processo de lavagem, alvejamento e funcionalização do substrato de proteína de PLA.

Quadro 04 - Reagentes e equipamentos no processo de lavagem, alvejamento e funcionalização dos substratos têxteis.

REAGENTES	FORNECEDOR
Hidróxido de Sódio (NaOH)	Quimis
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	Quimis
Detergente umectante	Quimis/ Sigma Aldrich
Sequestrante	Quimis
EQUIPAMENTOS	FORNECEDOR/MODELO
Balança analítica digital	Uni Bloc
Banho-maria	Marconi
Agitador magnético com controle de temperatura e velocidade	SOLAB
Estufa secadora	Ideoxima

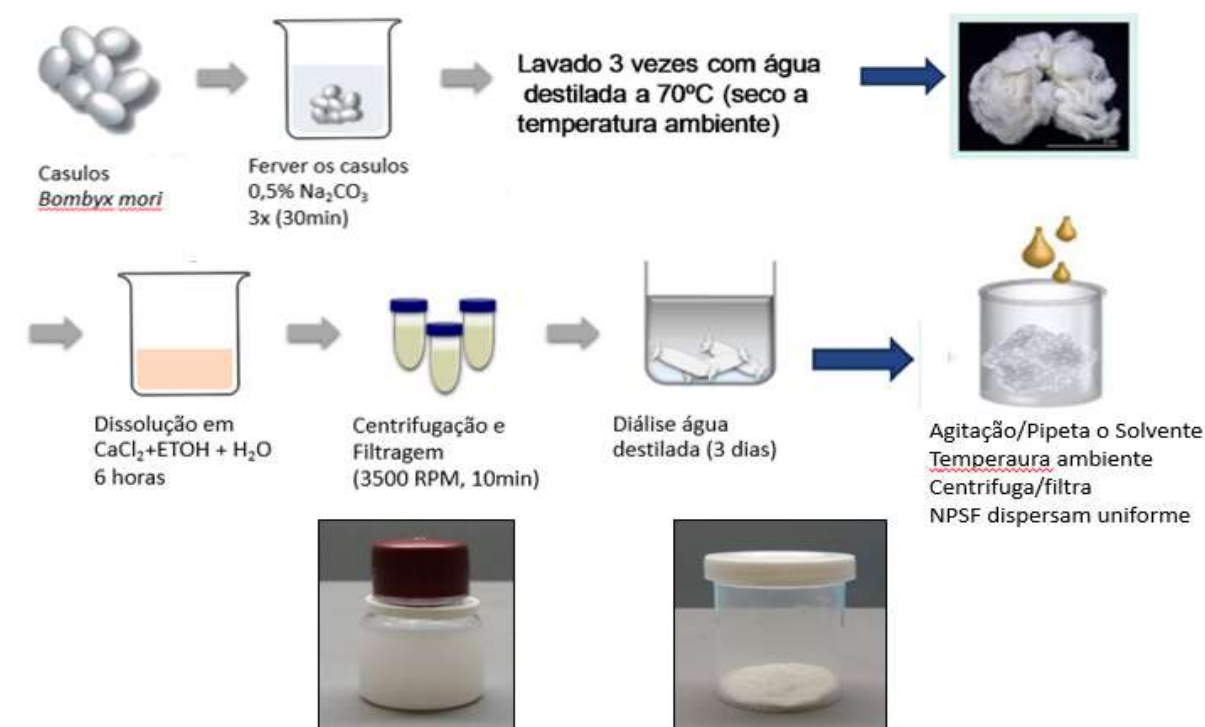
Fonte: AUTOR, 2017.

4.3.1 Procedimentos Experimentais

4.3.1.1 Síntese das Nanopartículas de Fibroína

Na figura 15 podemos observar um fluxograma geral de todo o processo de síntese das nanopartículas de fibroína de seda.

Figura 15: Fluxograma da síntese das NPF's



Fonte: AUTOR, 2017.

4.3.1.1.1 Extração de Sericina

Para realizar a extração da sericina e obter a fibroína pura, o casulo do bicho da seda, foi cortado em partes pequenas para aumentar a superfície de contato com a solução e assim facilitar no processo de desengomagem (figura 16).

Então 5g do casulo foi submetido a uma solução fervente alcalina de 0,5% de carbonato de sódio (Na_2CO_3) em ebulição por 30 minutos, sendo esse processo replicado por três vezes para a retirada parcial da sericina presente no casulo.

A fibroína livre de sericina (figura 17), produto da desengomagem, foi enxaguada em água corrente destilada por 20 minutos para retirar o excesso da solução alcalina e depois de limpa, as fibras foram colocadas em uma placa de Petri para secagem ao ar livre por cerca de 24 horas, em ambiente livre de contaminação.

Figura 16 – Casulos cortados



Fonte: Autor, 2017.

Figura 17 - Fibroína livre de sericina



Fonte: Autor, 2017.

4.3.1.1.2 Dissolução da Fibroína

Após a secagem, para preparar a solução de fibroína pura, a fibra foi solubilizada em sistema ternário composto de cloreto de cálcio (CaCl_2), etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) e água (H_2O) na proporção de 1:2:8 a uma temperatura de 80°C , segundo valores mostra a tabela 02.

Tabela 02 - Receita para a dissolução da SF.

Elementos	Quantidade
CaCl_2	110.9g
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	92mL
H_2O	144mL
Temperatura	80°C

Fonte: AUTOR, 2017.

A solução foi aquecida em um agitador até que atingisse a temperatura de aproximadamente 80°C para que as fibras secas fossem adicionadas. Depois a solução foi homogeneizada com bastão até que apresentasse um aspecto gelatinoso e amarelado (Figura 18).

Para determinar uma melhor dissolução e assim obter uma solução de fibroína mais pura, na preparação variamos o tempo de solubilização da fibra no sistema ternário. Foi usado os tempos de 2h – 4h – 6h e com a análise de DLS e Potencial Zeta, onde foi constatado que a solubilização por 6h atinge melhor satisfação da fibroína pura.

Figura18 - Solução após diluição da SF



Fonte: AUTOR, 2017.

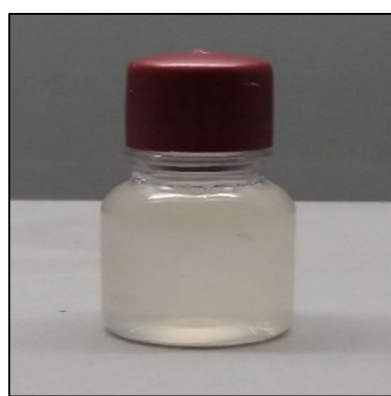
Por conseguinte, a solução de fibroína de seda (SSF) foi centrifugada para a remoção de agregados de fibroína, como também para resquícios do casulo original. Nesta etapa, onde ocorre a centrifugação da solução obtida após a diálise, a SF foi colocada em um tubo falcon de 15 mL para que este fosse inserido na centrífuga sob rotação de 4.500 RPM durante 20 min. Passado o tempo, o precipitado formado no fundo do tubo é removido e a solução é novamente submetida a centrifugação nas mesmas condições até que não houvesse precipitado. Logo após a centrifugação, a SF foi colocada em membranas de celulose semipermeáveis de pH neutro, para a realização da diálise, utilizando como meio dialisador a água destilada, sendo este trocado a cada 12 horas (figura 19).

Figura 19 - Diálise



Fonte: Autor, 2017.

Figura 20- Fibroína solubilizada



Fonte: Autor, 2017.

Esse processo é realizado por 3 dias para que seja retirado os sais e etanol utilizados na solubilização. Após esse período, a solução de SF livre de CaCl_2 foi

filtrada. A concentração final da solução foi de 2%, obtido pelo método de secagem. A solução foi estocada em geladeira a temperatura de 4°C.

4.3.1.1.3 Isolamento das Nanopartículas

A solução de fibroína formada foi rapidamente introduzida ao solvente orgânico miscível em água utilizando de agitação pipetada à uma temperatura ambiente. Geralmente usa-se como solventes principalmente metanol, etanol, propanol, isopropanol, tetrahidrofurano, acetona e acetonitrilo. No presente trabalho, foi utilizado acetona como solvente.

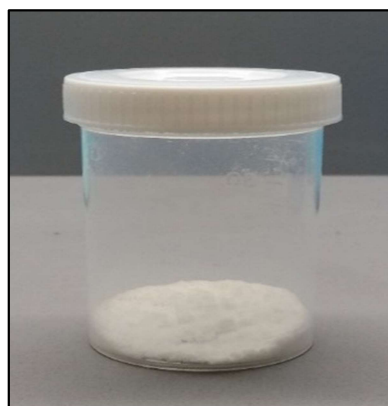
As nanopartículas de fibroína precipitadas foram coletadas e lavadas com água destilada em uma centrifugação de 3500 rpm por 15 minutos para separar essas partículas do solvente, acetona, filtradas e depois suspensas novamente em água. As nanopartículas dispersam uniformemente, parte foi mantida na forma de solução (figura 21), e outra parte foi liofilizada (figura 22), sendo ambas direcionadas para caracterização do material obtido.

Figura 21 - Solução de NPSF



Fonte: Autor, 2017

Figura 22 – NPSF liofilizada



Fonte: Autor, 2017

4.3.2.1 Preparação dos Substratos Têxteis

Primeiramente foi produzido com o fio de PLA uma malha tipo Jersey no Laboratório Têxtil de Malharia (figura 23)

Com a finalidade de remover as impurezas do substrato de PLA a sua pigmentação natural amarelada para posterior impregnação dos NPF's, foi realizado um processo de alvejamento, que consiste no branqueamento químico do substrato.

Figura 23 - Máquina de Malha



Fonte: AUTOR, 2017

Figura 24- Fabricação de malha



Fonte: AUTOR, 2017

A partir de 10 g do substrato de PLA, foi preparada uma receita contendo:

- 10,0 ml/L de H₂O₂ 50%
- 1,5 g/L de Estabilizador
- 2,5 g/L de NaOH 36° Bé
- 1,5 g/L de detergente/umectante
- 1,5 g/L de sequestrante

Foi utilizado 1,0 g do peso de material (PM) e uma relação de banho de 1:100 (1 g para 100 mL), com isso, o banho foi preparado e o volume do banho foi calculado de acordo com a Equação 1. O processo de alvejamento foi realizado em banho maria a 90°C durante 1h sob agitação com bastão de vidro a cada 10 min, em seguida foi lavada em água a 60°C, durante 20 min e posteriormente foi lavado em água destilada a temperatura ambiente, até a retirada de todo produto químico. Após 48h de secagem a temperatura ambiente (figura 25).

$$VB = PM \text{ (g)} \times 1/RB$$

(1)

Figura 25: Malha de PLA alvejada



Fonte: AUTOR, 2017

4.3.2 Técnicas de Caracterização

Algumas técnicas foram empregadas para caracterização estrutural e morfológica das nanopartículas de fibroína serão apresentadas abaixo.

4.3.2.1 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

As medidas de DLS foram realizadas no Laboratório do Núcleo de Pesquisas de Engenharia Química – NUPEQ/ UFRN. As análises foram realizadas no equipamento Zeta Plus Analyser Brookhaven Instruments Corporation (Figura 26).

O ensaio de tamanho de partícula foi realizado por meio do Espelhamento Dinâmico de Luz (DLS), utilizando uma alíquota da solução de nanopartículas de fibroína determinado pela média de 10 ciclos por ensaio em cubetas de plástico (10 mm de percurso) com as amostras numa concentração de 0,01% m/m em água destilada. Os experimentos foram conduzidos a temperatura de 25°C.

4.3.2.2 Potencial Zeta

As medidas do Potencial Zeta foram realizadas no NUPEQ/ UFRN. As análises foram realizadas no equipamento Zeta Plus Analyser Brookhaven Instruments Corporation (Figura 26).

O Potencial Zeta foi determinado pela média de 10 ciclos por ensaio em cubetas de plástico (10 mm de percurso) com as amostras numa concentração de 0,01% m/m em água destilada. Os experimentos foram conduzidos a temperatura de

25°C. As medidas do Potencial Zeta tiveram o objetivo de caracterizar o tipo de carga superficial e calcular seu ponto isoelétrico.

Figura 26 - Equipamento Zeta Plus.



Fonte: AUTOR, 2017.

As análises do Potencial Zeta foram realizadas nas amostras de nanopartículas de fibroína de seda, em todos os processos de fabricação.

4.3.2.3 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Foram realizadas no Laboratório de Caracterização Estrutural dos Materiais do Departamento de Engenharia dos Materiais da UFRN, em um equipamento do fabricante SHIMADZU, modelo IRTracer-100.

Para confirmar o resultado obtido na análise referida acima, um ensaio de FTIR foi realizado. Para isso uma pequena quantidade do material liofilizado foi colocada no equipamento Hitachi Tableto pmicroscope TM 3000 e o resultado encontrado plotado em gráfico.

A região de infravermelho de modo de absorbância foi obtida na região de espectro de $500 - 4000\text{cm}^{-1}$. Todas as amostras foram realizadas em modo de transmissão.

4.3.2.4 Difração de Raios X (DRX)

As análises de Difração de Raios (DRX) foram realizadas no Laboratório de Caracterização de Materiais do Departamento de Física/UFRN em um Difrátômetro Universal de raios-X: Rigaku, modelo Miniflex II, com radiação de cobre ($\text{CuK}\alpha = 1,54178 \text{ \AA}$), com potência de 30 kV e corrente de 30 mA, faixa de varredura de 5° a

45°, com passo varredura 0,01° e velocidade de 15°/minutos. Os gráficos foram plotados no programa Oringin 8.0.

Esta é uma técnica de caracterização microestrutural de materiais cristalinos, encontrando campo em diversas áreas de conhecimento. Basicamente, o fóton do raio-X ao atingir o elétron do material se espalha elasticamente sem perder a sua energia, mas mudando sua trajetória. Isso é captado pelo equipamento de DRX, fornecendo dados de cristalinidade ou amorfismo dos materiais.

A difração de raios-X pela técnica de pó permite uma avaliação do retículo cristalino. O difratograma obtido depende da estrutura do cristal, que por sua vez é determinada por fatores como: tipo de retículo, classe do cristal, parâmetros de cela unitária e a distribuição dos vários tipos de íons, moléculas que estão na cela. O número de reflexões e posição destas, em termos da posição angular (2θ) ou distância interplanar (d) e o perfil do difratograma dependem dos fatores citados anteriormente e do comprimento de onda dos raios X aplicado na amostra para a coleta dos dados. Já a intensidade do pico depende dos tipos de átomos presentes e suas respectivas posições e do tempo de exposição da amostra aos raios X.

Para estimar a média do diâmetro das partículas foi usada a equação de Scherrer (Equação 02) descrita abaixo:

$$D = k \cdot \lambda / \beta \cdot \cos\theta \quad (02)$$

Onde:

D = diâmetro médio das partículas em Ângström (Å);

k = constante que depende do formato da partícula (0,89);

λ = comprimento de onda de radiação usado (Cu = 1,5418Å);

β = largura a meia altura do pico difratado da amostra em radianos;

θ = ângulo de Bragg (metade do ângulo entre o feixe difratado e o feixe original).

A distância interplanar pode ser calculada usando a lei de Bragg e a equação de Paul Scherrer (Equação 03). A distância interplanar pode ser calculada pela equação:

$$d = \lambda / 2\sin(\theta) \quad (03)$$

Onde:

d = distância interplanar em Ângström (Å);

λ = comprimento de onda de radiação usado (Cu = 1,5418Å);

θ = ângulo de Bragg (ângulo 2θ observado no difratograma).

4.3.2.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) é muito efetiva na observação da morfologia de NPF's, destacando-se como vantagem sua capacidade de alta resolução, permitindo observar o diâmetro da nanopartícula e seu formato. De modo geral, a partir das imagens de MET é possível identificar a pureza e a qualidade de uma amostra da nanopartícula de fibroína.

As análises do MET foram realizadas em equipamento modelo JEM-1230 JEOL, no laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão da Fundação Oswaldo Cruz na Bahia. Esta análise apresenta alta resolução e é utilizada para identificar a superfície das nanopartículas de fibroína. As análises foram realizadas com tensão de aceleração de 300 kV e faixa de ampliação de 50 a 800 mil vezes.

4.3.2.6 Microscopia Eletrônica de Varrimento com Emissão de Campo (MEV-FEG)

Para análise microestrutural foram obtidas micrografias utilizando o microscópio eletrônico de varredura (MEV) de bancada, modelo TM 3000 HITACHI, e para a obtenção das micrografias das amostras das NPF's foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo (MEV-FEG), modelo Zeiss Auriga 40 do Laboratório de Caracterização Microestrutural do DEMAT – UFRN.

As amostras das malhas de PLA funcionalizadas com a nanopartícula de fibroína foram analisadas como corpo de prova compactado e apenas depositadas no suporte e planificadas para a correta medição do equipamento.

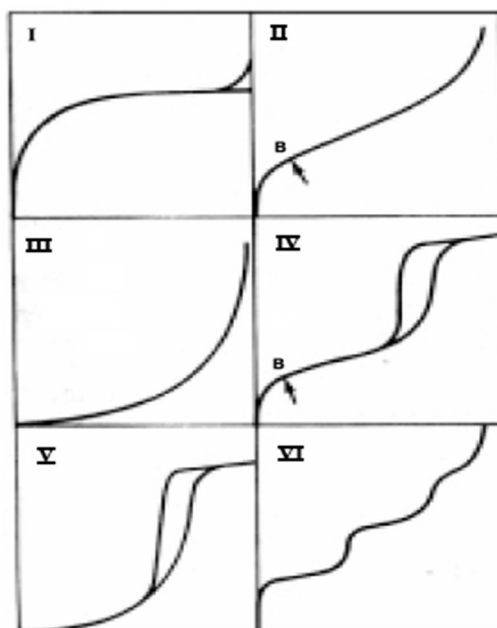
4.3.2.7 Determinação de área específica pelo método BET

Método BET é uma teoria matemática, com o objetivo de descrever a adsorção física de moléculas de gás sobre uma superfície sólida, e serve como base para uma técnica de análise importante para medição de área superficial específica de um material. O método de BET (Brunauer, Emmett, Teller), é uma extensão a teoria de Langmuir e introduz o conceito de adsorção de multicamadas.

Para Texeira (2001), quando o estudo do fenômeno de adsorção é feito com o objetivo de se obter informações sobre a área específica e a estrutura porosa de um sólido, a construção de uma isoterma de adsorção é de fundamental importância, pois sua forma revela muitos detalhes sobre as características do material. A isoterma mostra a relação entre a quantidade molar de gás adsorvida ou dessorvida por um sólido, a uma temperatura constante, em função da pressão do gás. Por convenção, costuma-se expressar a quantidade de gás adsorvida pelo seu volume V_a em condição padrão de temperatura e pressão (0°C e 760 torr), enquanto que a pressão é expressa pela pressão relativa P/P_0 , ou seja, a relação entre a pressão de trabalho e a pressão de vapor do gás na temperatura utilizada.

O formato da isoterma é função do tipo de porosidade do sólido. Várias são as formas de isotermas conhecidas até hoje porém, todas são variações de seis tipos principais. Os cinco primeiros tipos foram primeiramente sugeridos por Brunauer em 1938, sendo o sexto tipo proposto mais tarde. A figura 27 mostra os seis tipos de isotermas.

Figura 27: Isotermas (n versus P/Po) do tipo I ao tipo VI.



Fonte: TEXEIRA, 2001.

A isoterma do tipo I é característica de sólidos com microporosidade. As isotermas do tipo II e IV são típicas de sólidos não porosos e de sólidos com poros razoavelmente grandes, respectivamente. As isotermas do tipo III e V são características de sistemas onde as moléculas do adsorvato apresentam maior interação entre si do que com o sólido. Estes dois últimos tipos não são de interesse para a análise da estrutura porosa. A isoterma do tipo VI é obtida através da adsorção do gás por um sólido não poroso de superfície quase uniforme, o que representa um caso muito raro entre os materiais mais comuns.

Pode-se perceber que o tipo de isoterma é função do efeito do tamanho do poro sobre o fenômeno de adsorção. De acordo com as curvas conhecidas, foi estabelecida uma classificação dos poros em função de seu diâmetro (tabela 03), já que este é seu principal parâmetro dimensional.

Tabela 03: Classificação dos poros segundo seu diâmetro.

CLASSIFICAÇÃO	DIÂMETRO
<i>Microporo</i>	$\bar{\phi} < 20$
<i>Mesoporo</i>	$20 < \bar{\phi} < 500$
<i>Macroporo</i>	$\bar{\phi} > 500$

Fonte: TEXEIRA, 2001.

4.3.2.8 Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade tem como objetivo detectar o potencial de um material ou dispositivo em produzir efeitos letais ou subletais em sistemas biológicos a nível celular. Este ensaio deve ser aplicado a todas as categorias de biomateriais.

Com o objetivo de avaliar a toxicidade das nanopartículas de fibroína de seda, foram realizados ensaios de citotoxicidade com células codificadas como RAW, denominadas como macrófagos. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biologia da Malária e Toxoplasmose – LABMAT/ UFRN.

Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pelo composto/extrato em estudo no metabolismo celular de glicídeos usualmente através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) pela atividade daquelas enzimas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular.

O meio de cultura suplementado com soro fetal bovino (SBF) e solução de antibióticos (penicilina 10.000u/mL e estreptomicina 10.000µg/mL). Normalmente, para células aderentes, é utilizado o meio DMEM simples ou rico em glicose, o qual deve ser suplementado com SFB (10%) e solução de antibióticos (1%).

Para a solução de MTT (0,5mg/mL) foi preparado de 10 mL da solução de MTT (0,5mg/mL), proceder da seguinte maneira:

- Preparo da solução estoque a 5mg/mL: Pesar 5mg de MTT e solubilizar em 1 mL de PBS estéril.
- Preparo da solução 0,5mg/mL:

$$CV=CV$$

$$5\text{mg/mL} \times V = 0,5\text{mg/mL} \times 10 \text{ mL}$$

$$V = 1 \text{ mL da solução estoque}$$

Dessa forma, para preparar 10 mL da solução a 0,5mg/mL deve-se utilizar 1 mL da solução estoque e adicionar 9 mL de meio completo.

Observações: Este cálculo mostra as quantidades de solução estoque, PBS estéril e de meio completo necessários para preparar 10 mL da solução de MTT a 0,5mg/mL, que se refere à quantidade necessária para executar o ensaio em uma placa de 96 poços completa. Se você não for utilizar uma placa inteira, reajustar os cálculos!

Para preparar uma suspensão celular (0,5X10⁵ células/mL), proceder da seguinte maneira:

- Determinar o número de células existentes nas garrafas de cultivo celular
- Uma vez determinado o número de células (onde o resultado será expresso em células/mL), fazer regra de três para determinar a quantidade da suspensão celular (proveniente das células da garrafa), bem como a quantidade de meio completo a ser utilizada. Exemplo: Se você determinou o número de 5 x10⁵ células/mL na contagem deverá fazer a seguinte regra de três:

$$\begin{array}{rcl} & 5 \times 10^5 & \text{-----} 1000\mu\text{l} \\ & 0,5 \times 10^5 & \text{-----} X \\ & X = & 100\mu\text{l} \end{array}$$

Ou seja, em 100 µl da suspensão celular da garrafa você possui 0,5 X 10⁵ célula. Para obter 1 mL de uma suspensão de 0,5X10⁵ células/mL, bastaria pegar os 100 µl da suspensão celular da garrafa e adicionar 900 µl de meio completo. Posteriormente, você deve ajustar os cálculos para quantos mL de suspensão celular necessitará para realizar o teste.

4.3.2.9 Ensaio de Adesão Celular

Com o objetivo de avaliar a adesão celular da malha de PLA, foram realizados ensaios de adesão com células RAW (macrófagos) com as nanopartículas de fibroína funcionalizadas com e sem quitosana nas concentrações de 2,5; ,0,15; 0,1 e 0,2 µg/mL de nanopartículas de fibroína.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biologia da Malária e Toxoplasmose – LABMAT/ UFRN.

As células foram cultivadas em placas de 96 poços em meio DMEM (do inglês: Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino até atingir a confluência. A placa foi incubada por 24 horas a 37 °C e em atmosfera de 5% de CO₂. Após aderência das células, foi retirado o meio e adicionado as amostras de PLA Alvejado, PLA com quitosana, PLA funcionalizado com quitosana e nanopartículas de fibroína e PLA com nanopartículas de fibroína. Como controle positivo (C⁺) foi utilizado o fundo da placa e o controle negativo (C⁻) foram as células flutuantes. Todas as amostras foram incubadas por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e após este período as placas foram retiradas para a realização das fotografias e depois incubadas novamente para posteriores observações. O tempo total do ensaio foi de 72h.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos nas caracterizações estruturais e morfológicas da fabricação de nanopartículas de fibroína pelo método via sistema ternário. Esse método foi utilizado para remover as moléculas de água que ligam as partículas em solução aquosa de forma eletrostática.

5.1 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A estabilidade das partículas em suspensão foi testada em água deionizada usando dispersão de luz dinâmica (DLS). As soluções obtidas tiveram seus tamanhos mensurados. Nanopartículas serão uniformes quando obtém uma ótima polidispersão pois caracteriza uma melhor uniformidade das partículas.

Quanto menor o tamanho da nanopartícula, maior será a porcentagem de átomos superficiais e assim propriedades como efeito catalítico serão alteradas. Portanto, é de consenso geral que o tamanho das nanopartículas é um fator de elevada importância não apenas para caracterização do material recém-sintetizado, mas também na definição de suas aplicações.

Inicialmente para determinar o melhor tamanho de partícula os ensaios de DLS, assim como o de Potencial Zeta, foi realizado com os mesmos parâmetros variando apenas o tempo em que a solução de fibroína foi solubilizada em sistema ternário (CaCl_2) ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) (H_2O). Na tabela 04 e Figuras 28 a ,b e c; podemos observar que quanto maior tempo de dissolução da SF implicou em uma nanopartícula menor, isso provavelmente ocorreu pelo fato do tempo de solubilização das moléculas no sistema ternário, pois a SF se encontra melhor purificada e uniforme.

Tabela 04: DLS das NPSF com variação de tempo.

Tempo de dissolução (horas)	Tamanho (nm)	Polidispersão
2	310,5 \pm 14,8	0,0005
4	156,1 \pm 4,1	0,086
6	48,9 \pm 0,7	0,249

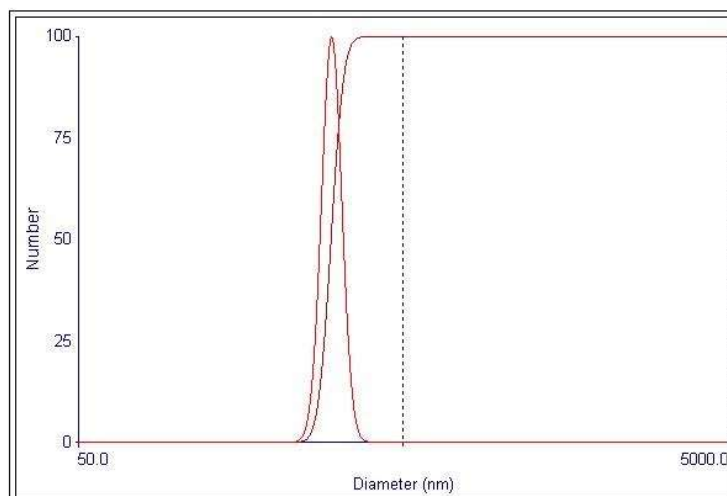
Fonte: AUTOR, 2017

Figura 28: Gráfico DLS das NPSF com variação de tempo. a) NPSF 2h b) NPSF 4h c) NPSF 6h

Nano 2h (Combined)
Mar 17, 2017 13:56:01

Effective Diameter: 310.5 nm
Polydispersity: 0.005
Avg. Count Rate: 99.8 kcps
Baseline Index: 9.2/ 98.88%
Elapsed Time: 00:05:00

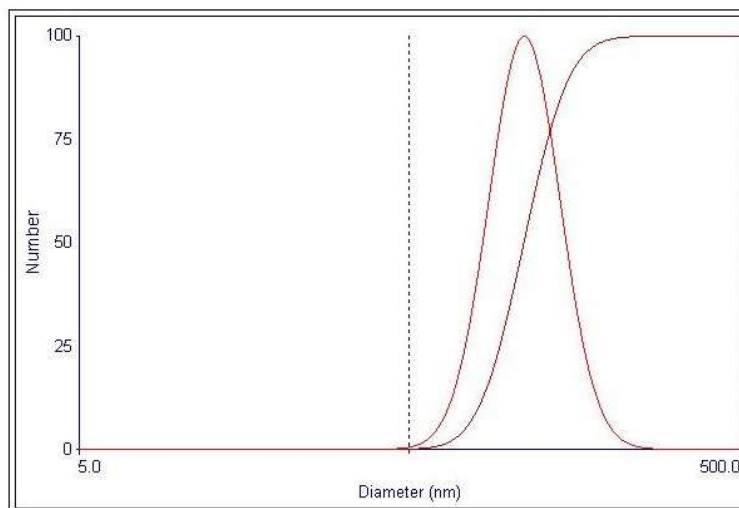
a)



Nano 4% (Combined)
Mar 17, 2017 14:08:05

Effective Diameter: 156.1 nm
Polydispersity: 0.083
Avg. Count Rate: 136.1 kcps
Baseline Index: 9.1/ 97.62%
Elapsed Time: 00:05:00

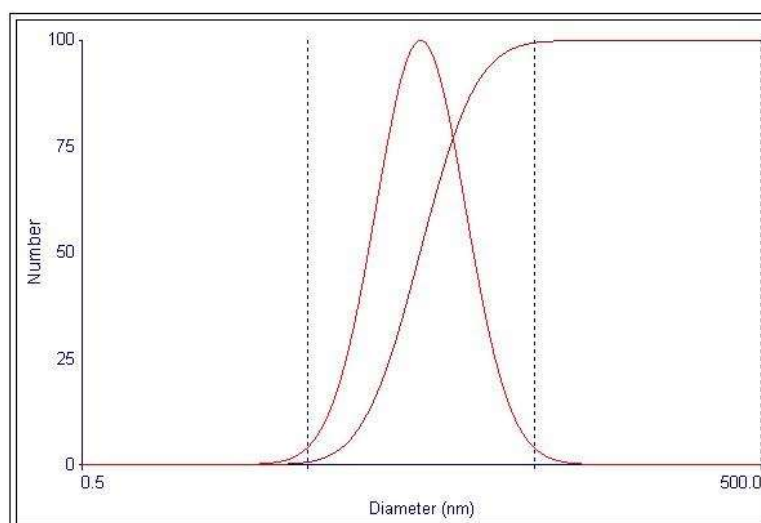
b)



Nano 6% (Combined)
Mar 17, 2017 14:18:47

Effective Diameter: 48.9 nm
Polydispersity: 0.249
Avg. Count Rate: 81.0 kcps
Baseline Index: 9.3/ 99.17%
Elapsed Time: 00:05:00

c)



Fonte: AUTOR, 2017.

O melhor valor observado para a NPSF's no DLS foi das NPSF com o tempo de dissolução realizado em 6 horas, como mostra a tabela 05 e figura 28 c), $48,9 \pm 0,7$ e polidispersão de 0,249. Vários AUTORES defendem que quando nanosistemas apresentam um tamanho entre 100 nm e 200 nm o sistema retículo endotelial facilmente fagocita essas partículas, tornando fácil o acesso ao interior da célula, além disso, uma polidispersão abaixo de 0,3 apresenta como um bom resultado, uma vez que as nanopartículas apresentam uma homogeneidade na sua distribuição.

Tabela 05 – Gráfico de DLS da NPSF com tempo de 6h.

Run	Eff. Diam. (nm)	Half Width (nm)	Polydispersity	Baseline Index
1	46.3	22.8	0.242	9.7 / 95.83%
2	48.4	25.7	0.281	9.7 / 100.00%
3	50.0	26.5	0.280	9.8 / 100.00%
4	49.9	25.6	0.263	10.0 / 100.00%
5	49.0	24.5	0.251	8.9 / 100.00%
Mean	48.7	25.0	0.263	9.6 / 99.17%
Std. Error	0.7	0.6	0.008	0.2 / 0.83
Combined	48.9	24.4	0.249	9.3 / 99.17%

Fonte: AUTOR, 2017.

5.2 Potencial Zeta

O Potencial Zeta expressa a carga que uma determinada partícula apresenta em relação ao meio circundante, influenciando em sua aglomeração e consequentemente na absorção celular. (BERG, 2009). Um bom resultado de carga das partículas implica na maneira rápida em que eles se movem.

O resultado obtido pelo presente estudo foi de $-19,95\Omega$, mensurado em uma suspensão aquosa de nanopartículas. A elevada presença de cargas negativas ao redor das nanopartículas permite uma estabilização dessas diminuindo, portanto, a aglomeração.

A carga superficial das NPSF', é suficiente para prevenir a agregação das partículas e fornecer estabilidade delas. A carga é importante para determinar se as nanopartículas se aglomeram no fluxo sanguíneo ou aderem ou interagem com uma célula carregada positivamente. (SUBIA & KUNDU, 2012).

5.3 Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier (FT-IR)

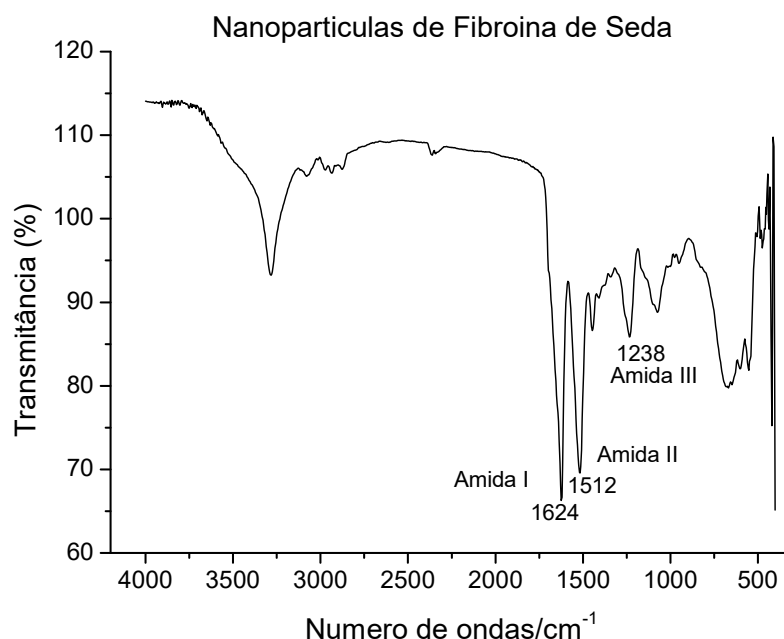
A análise de FTIR foi realizada com a finalidade de caracterizar a estrutura dos principais grupos funcionais presentes nas NPSF's. A Figura 29 mostra os espectros de absorção na região do infravermelho, em transmitância da NPSF's. A Tabela 06 contém as bandas observadas e as deformações correspondentes a cada ligação.

O FTIR fornece a informação sobre a confirmação de uma estrutura secundária de proteína. Espectroscopia FTIR trabalha com o princípio da radiação infravermelha, indicando os comprimentos de onda da radiação absorvida pelas diferentes amostras. Entender qual a conformação exata da nanopartícula é essencial para definir a sua solubilidade, assim como, a sua topografia, portanto um ensaio de espectroscopia de infravermelho foi realizado (RODRIGUEZ-NOGALES *et al.*, 2016).

Para Zhang *et al.* (2017), encontramos representados que nos picos presentes entre a região de 1600 cm⁻¹ e 1640 cm⁻¹ são relatados como aquelas correspondentes ao grupo Amida I (C=O), a região correspondente a 1520 cm⁻¹ e 1540 cm⁻¹ corresponde ao grupo amida II (N-H) e as regiões entre 1230 cm⁻¹ e 1270 cm⁻¹ pela amida III (C-N e N-H). Essas posições da banda corresponde as conformações de material proteico, representando estrutura β -folha para a amida I, II, III

A partir da análise de FTIR foi possível identificar as diferentes conformações moleculares da fibroína de seda, ou seja, as bandas de absorção associadas às amidas I, II e III.

Figura 29 – FTIR das NPSF



Fonte: AUTOR, 2017.

Cada composto possui um conjunto característico de bandas de absorção em sua região do espectro infravermelho. Proteína e polipéptidos mostra suas bandas características nas regiões espectrais de Amidas I e Amidas II. O resultado de FTIR mostrou que nas nanopartículas, a presença da proteína mostra bandas de vibração características para Amida I e II.

As bandas intramoleculares de beta folha que aumentam durante o processo de formação das nanopartículas de fibroína, devido uma interação que há entre o solvente orgânico e a região hidrofóbica da fibroína.

Tabela 06: Principais grupos observados no espectro FTIR das NPSF.

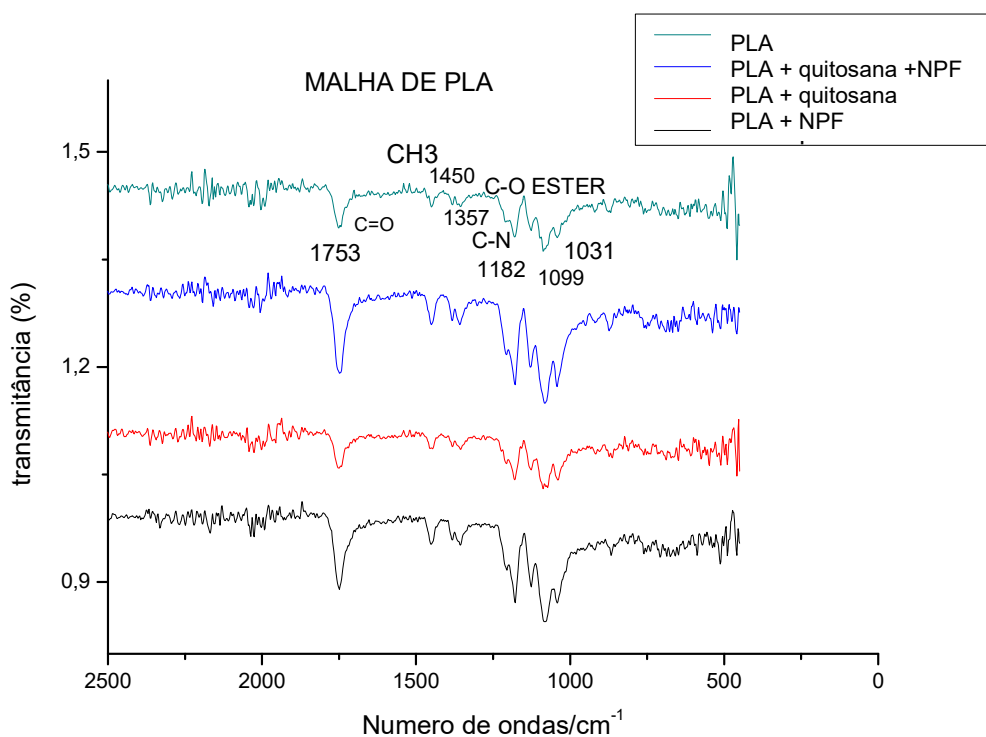
Número de onda (cm ⁻¹)	Tipo de deformação	Atribuição
1624	Alongamento de grupos C=O	Amida I
1512	Alongamento de grupos N-H	Amida II
1238	Alongamento de grupos C-N	Amida III

Fonte: AUTOR, 2017.

O Espectro de Infravermelho mostra bandas de absorção na região de 1624 cm⁻¹, correspondente ao alongamento C=O grupo. Já a banda de absorção a região

de 1512 cm^{-1} , corresponde ao alongamento N-H (tabela 06). Esses dois picos encontrados são característicos da forma II da fibroína, sendo o primeiro indicando a região de vibração da amida I e o segundo pico, região da amida II, característicos da forma de fibroína II, que apresenta uma maior predominância de conformação de beta folha, cristalina e insolúvel.

Figura 30 – FTIR das NPSF na malha de PLA



Fonte: AUTOR, 2017.

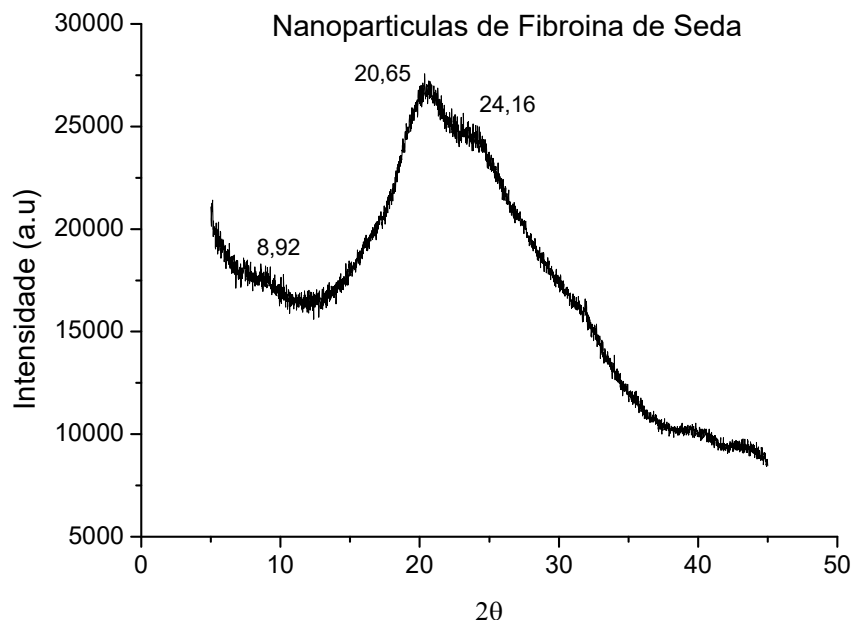
5.4 Difração de Raios X (DRX)

Assim como a espectroscopia de infravermelho, a difração de raio X tem como objetivo principal analisar a cristalinidade da molécula de fibroína, comprovando a conformação de beta folha.

O espectro do DR-X das NPSF's mostrado na figura 31 apresentaram picos de difração característicos de folhas β cristalinas. Esta é uma característica típica do padrão de espalhamento da fibroína de seda amorfa. Quando a solução de fibroína

foi imersa em acetona, os picos de difração característicos da conformação de folha b-cristalina ocorreram.

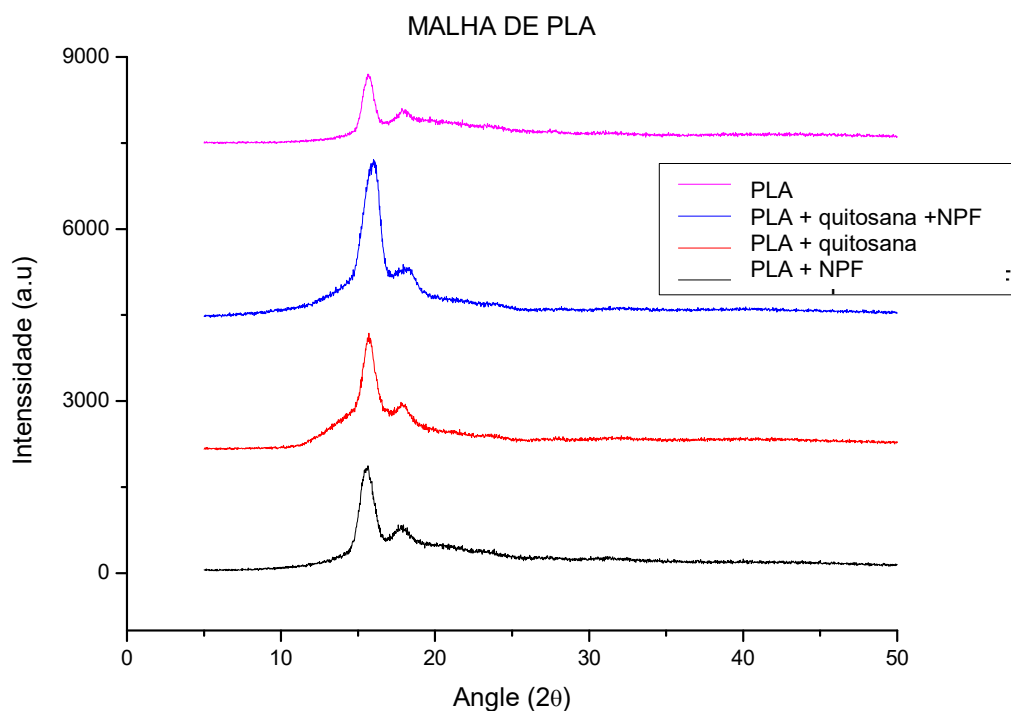
Figura 31 – DR-X das NPSF



Fonte: AUTOR, 2017.

O pico de maior intensidade mostra $2\theta = 20,65^\circ$, e dois picos menores em $8,92^\circ$ e $24,6$. Estes picos são semelhantes com o estudado na literatura como descreve (ZHANG *et al.*, 2007, LOZANO-PEREZ *et al.*, 2015). Esses picos indicam que a cristalinidade das nanopartículas de fibroína de seda regenerada líquida diminuiu consideravelmente em comparação com a fibra de seda nativa por causa da clivagem de muitas ligações de amida nas cadeias da molécula de seda durante a solubilização da proteína em CaCl_2 por sistema ternário.

Figura 32: DR-X na malha de PLA

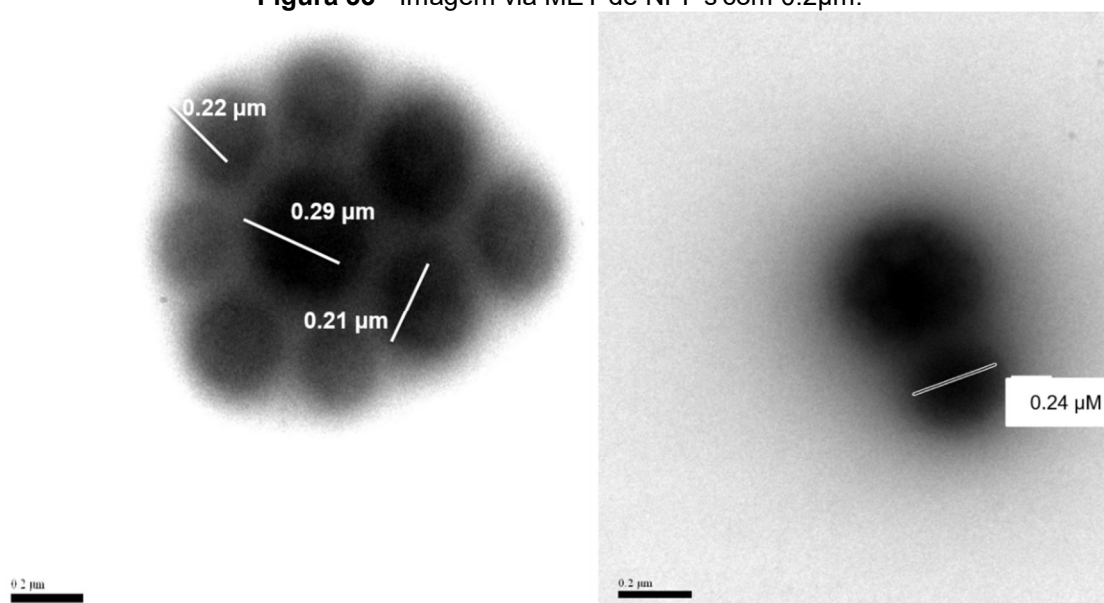


Fonte: AUTOR, 2017

5.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A figura 33 mostram as imagens de microscopia via MET das NPF's mostram o diâmetro das nanopartículas em concordância com as medições do DLS e BET. Fazendo uma média da amostra vista confirmamos o diâmetro da nanopartícula com média de 0.22 μm . Ainda pode observar uma partícula de formato esférico uniforme e densa. Percebe-se ainda que as nanopartículas de fibroína tende a se aglomerar.

Figura 33 - Imagem via MET de NPF's com 0.2 μ m.



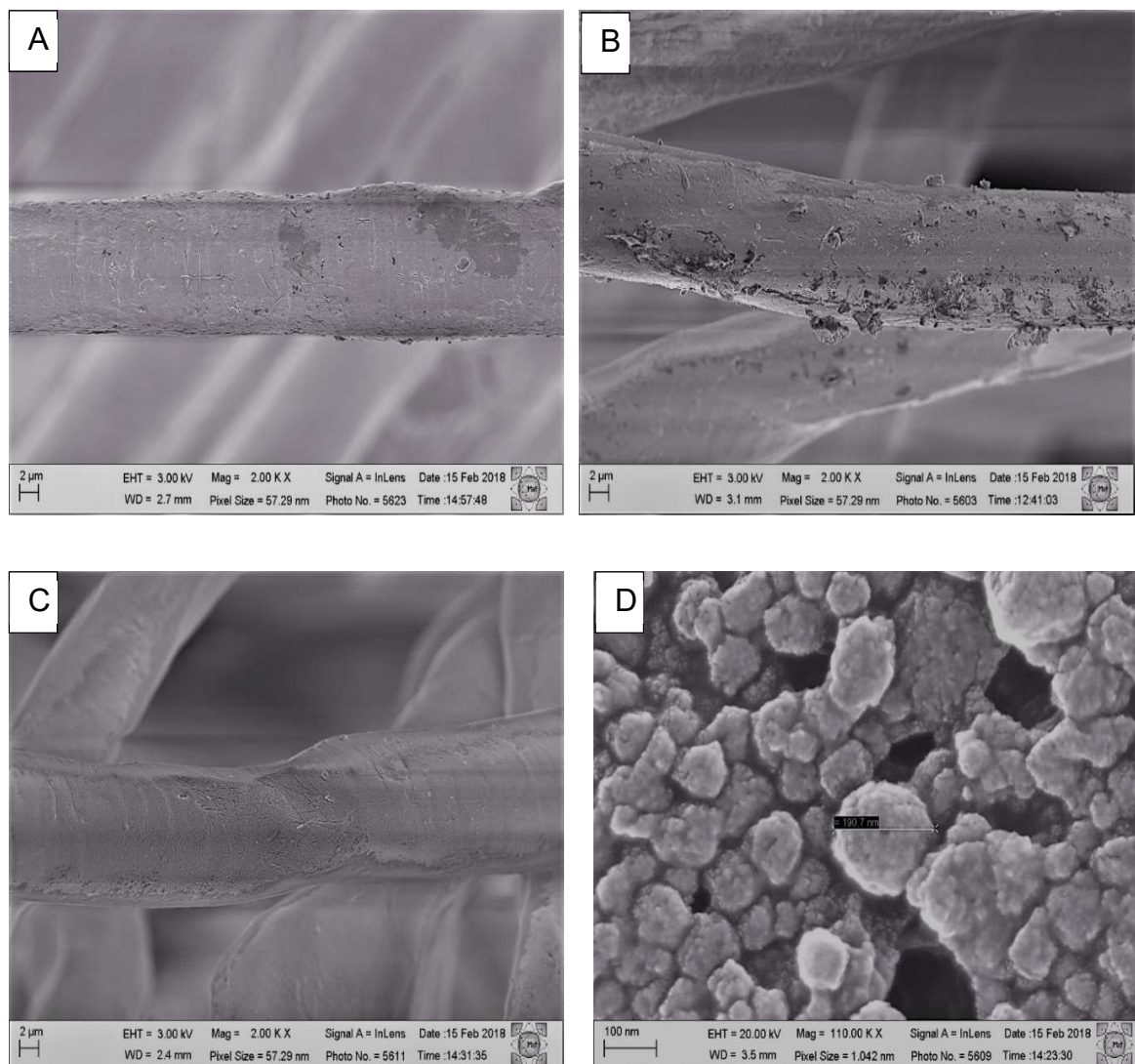
Fonte: AUTOR, 2017.

5.6 Microscopia Eletrônica de Varrimento com Emissão de Campo (MEV-FEG)

A figura 34 mostram as imagens de micrografia via MEV-FEG de amostras de: A - malha de PLA, B - nanopartícula de fibroína, C - da malha de PLA funcionalizada com as NPF's e D - da malha de PLA modificada com quitosana.

Podemos observar que em comparação entre a figura A e figura C a malha de PLA não conseguiu ser revestida pelas nanopartículas de fibroína, isso já era esperado pois as duas possuem cargas iguais (negativas), não ocorrendo a fixação da solução de NPF's. Já na figura D podemos observar uma alta concentração da quitosana envolvendo a fibra, provocando uma adesão escamosa e bastante concentrada em alguns pontos.

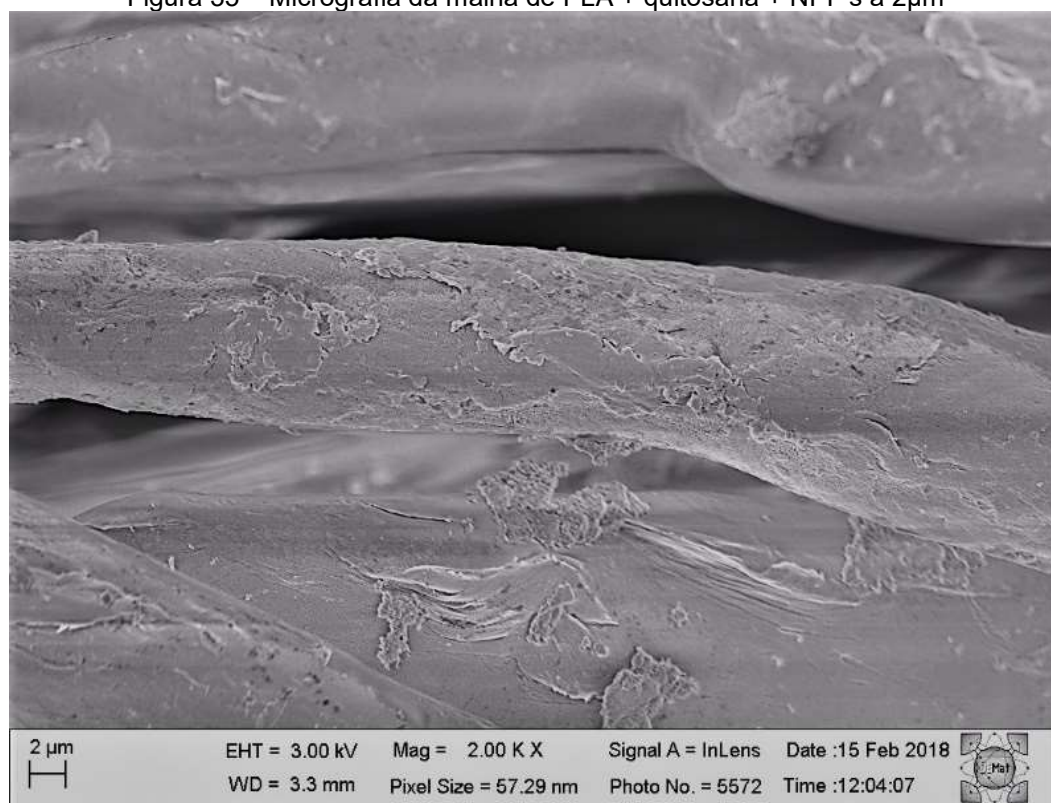
Figura 34 - A - malha de PLA, B - nanopartícula de fibroína, C - malha de PLA funcionalizada com as NPF's e D - malha de PLA modificada com quitosana.



Fonte: Autor, 2018.

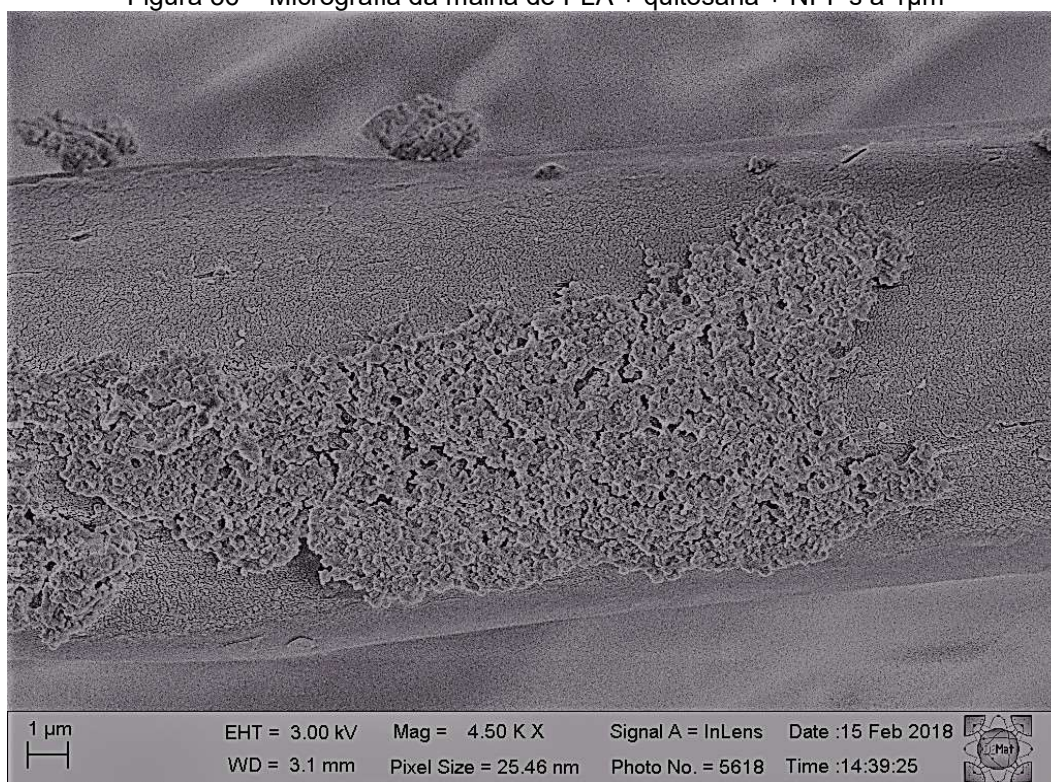
Já na figura 35 e 36 temos a malha de PLA funcionalizada com a solução de quitosana mais as nanopartículas de fibroína, onde podemos observar na micrografia a adesão aglomerada das NPF's na malha. Esse efeito não era esperado, mas a provável causa foi a mal escolha do método de funcionalização por dip coating, pois o mesmo não permitiu a aderência da solução de NPF's em toda a malha, assim concentrando em alguns pontos.

Figura 35 – Micrografia da malha de PLA + quitosana + NPF's a 2µm



Fonte: AUTOR, 2018

Figura 36 – Micrografia da malha de PLA + quitosana + NPF's a 1µm



Fonte: AUTOR, 2018

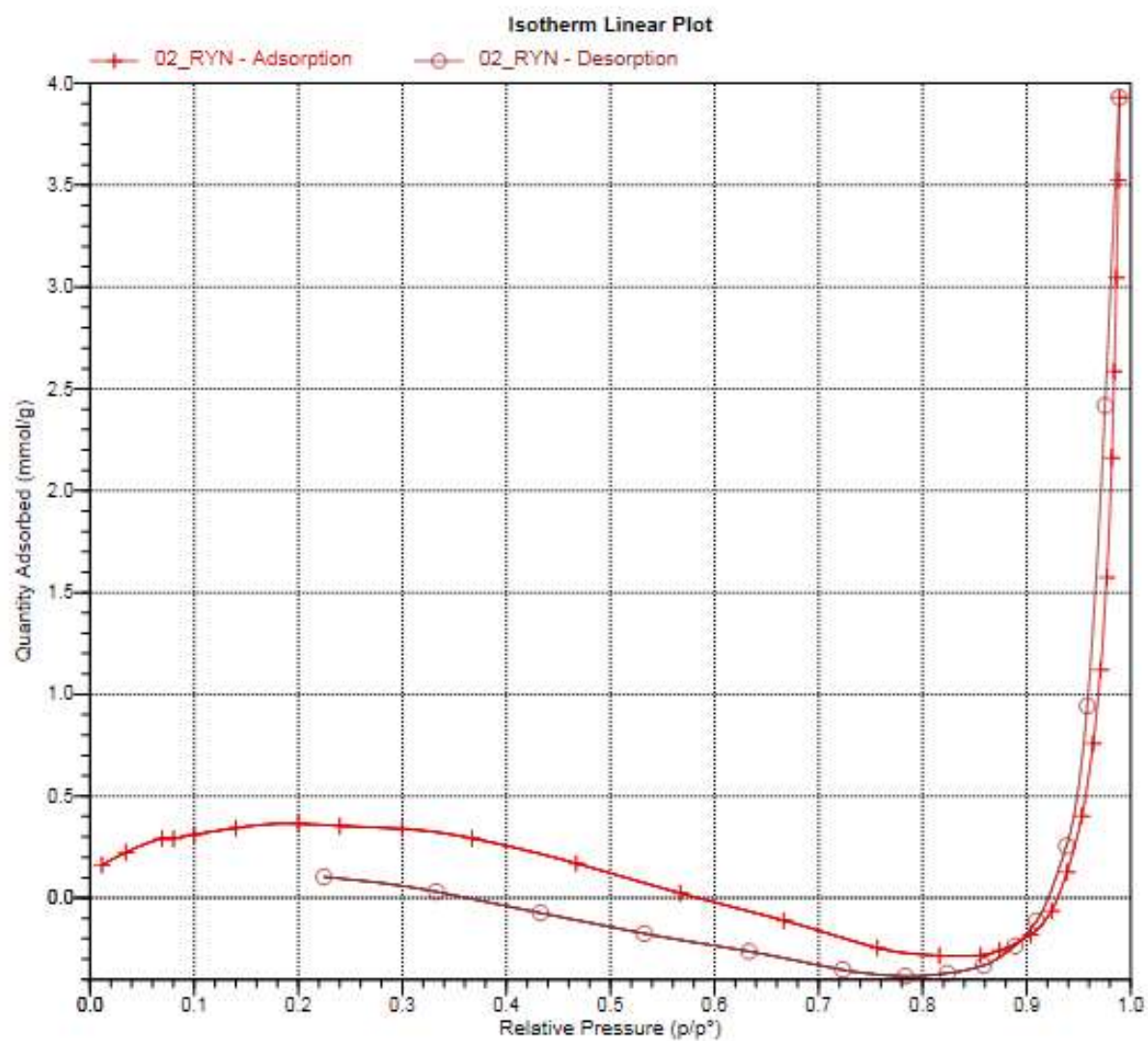
5.7 Determinação de área específica pelo método BET

Como podemos analisar na Figura 37 temos o isoterma de adsorção e dessorção de N₂ da nanopartícula de fibroína. O isoterma foi semelhante ao Isoterma Tipo III, com loops de histerese de tipo H3 de alta pressão relativa, de acordo com a classificação da IUPAC (ABBAS *et al.*, 2015).

Isso é conhecido como uma característica de materiais porosos com distribuições de tamanho altamente uniforme. Dos dois ramos de isotermas de adsorção de dessorção, a presença de um passo de adsorção afiado na região P / P_0 de 0,85 a 0,9 e um ciclo de histerese a uma pressão relativa maior do que 0,8, indica que os materiais processados são bem definidos como uma série regular de materiais porosos.

A área de superfície específica e o volume dos poros foi calculado usando Brunauere Emmette Teller (BET) e Barrette Joynere Halenda (BJH), respectivamente. A estrutura de dados do material BET mostrou que a NPF's tem uma área de superfície BET elevada (20,5574 m²/g), um grande volume de poros (0,136 cm³/g), apresenta ainda um mesoporo (174, 453 Å) e tamanho da nanopartícula (0,2918 µm) indicativo de seu potencial de aplicação como o crescimento celular máximo por adesão às superfícies.

Figura 37: isoterma de adsorção e dessorção de N₂ da nanopartícula de fibroína



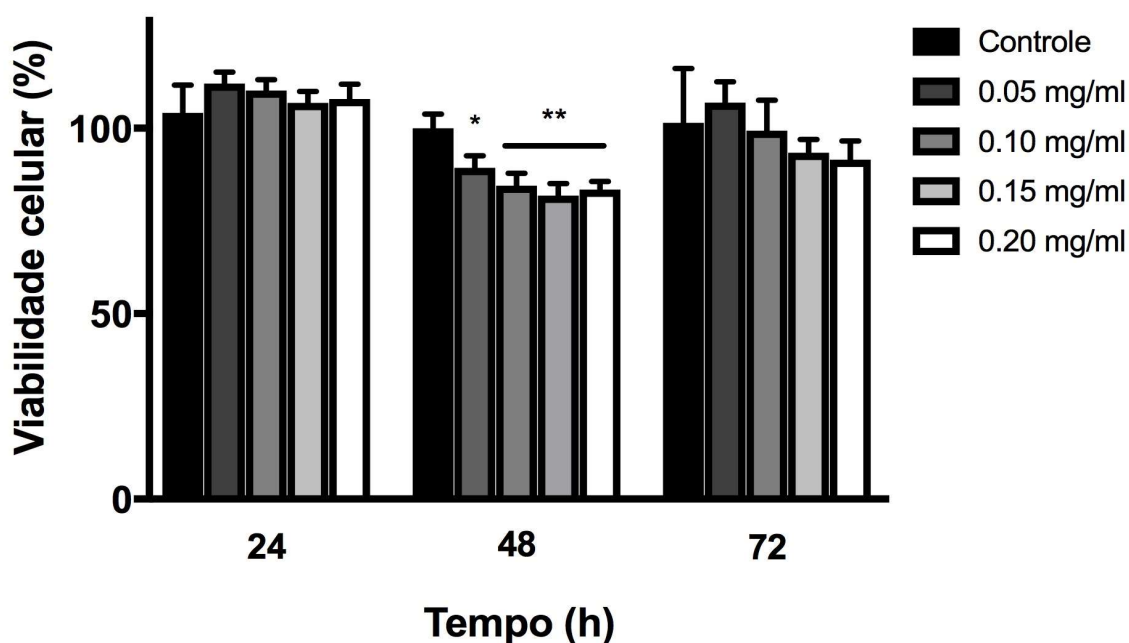
Fonte: AUTOR, 2017.

5.8 Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade com as células RAW foram realizados com a finalidade de conhecer a viabilidade celular em função dos processos de funcionalização realizados. Foram avaliadas diversas concentrações das NPF's de (2,5; ,0,15; 0,1 e 0,2 µg/mL) e comparadas ao controle positivo. A quantificação das células viáveis foi realizada após 72 horas de exposição com as NPF's.

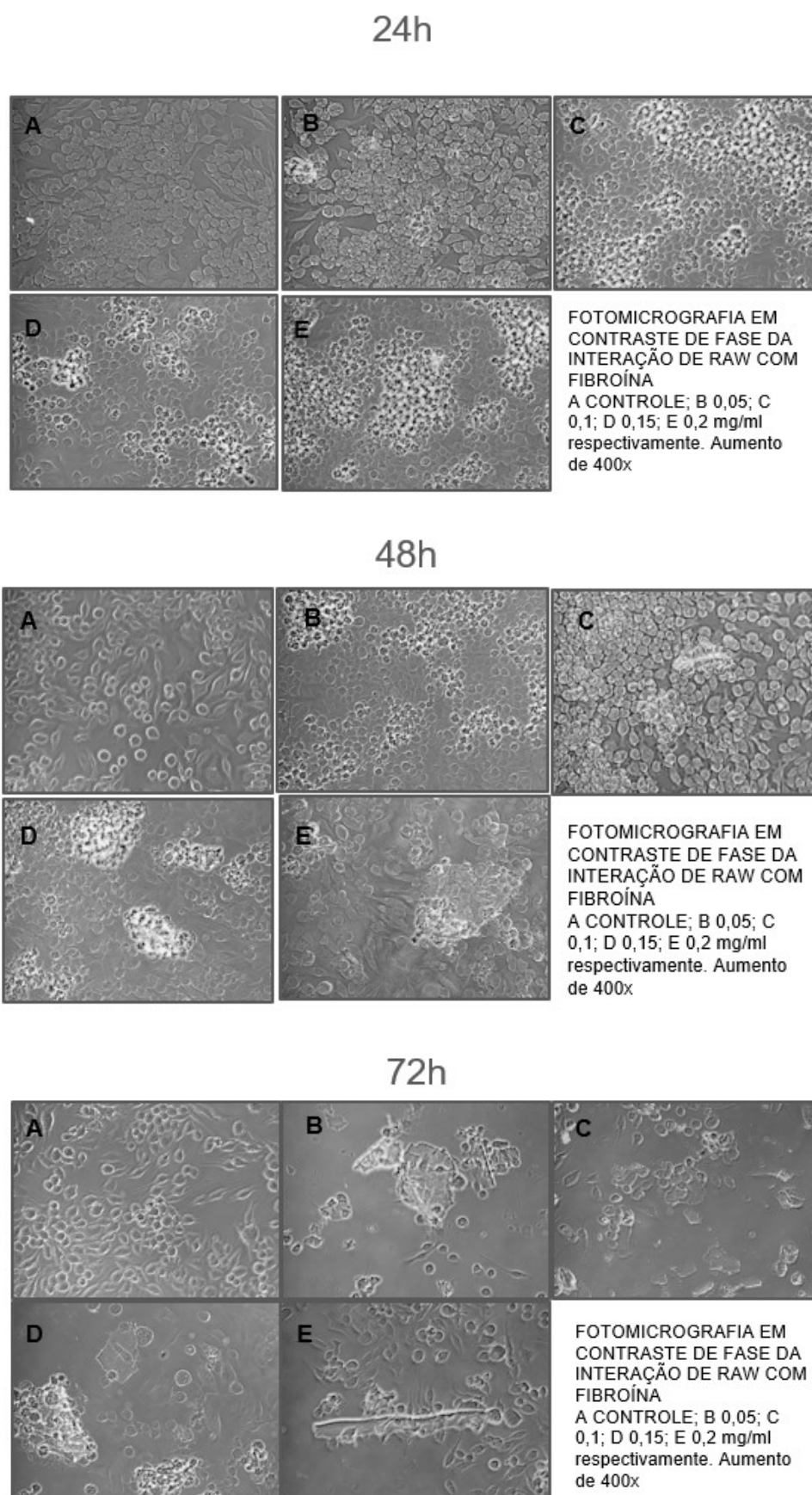
Na Figura 38 são apresentados os resultados obtidos a partir dos testes de citotoxicidade em termos de viabilidade celular para as amostras de nanopartículas. Foi realizado teste t de comparação com o controle * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Figura 38 - Resultados dos ensaios de citotoxicidade para diferentes concentrações de NPF's.



Fonte: AUTOR, 2017.

Figura: 39: Interação de RAW com fibroína a) após 24h b) após 48h c) após 72h



Fonte: AUTOR, 2017.

Analisando a Figura 39 a e b, percebemos que um período de 24h as células ainda estão reconhecendo as NPF's que se encontram agrupadas. A partir de 48h percebemos um ataque das células nas concentrações de NPF's e havendo algumas mortes celular, já configurando um material toxico para maiores concentrações.

Pode-se observar que em 24h e em 72h (figura 39 c) as concentrações apresentaram pouca variação de viabilidade celular. Com relação aos resultados obtidos em 48h houve um aumento expressivo do número de células cultivadas nas maiores concentrações das NPF's em relação ao controle. Pode-se explicar essa variação pela expansão celular após 48h e proliferação e ataque das células, acontecendo provavelmente morte celular. Portanto as NPF's nas concentrações maiores que 0,1 mg/ml começam a apresentar comportamento toxico quando utilizados níveis de $p < 0,01$

As amostras das células RAW com concentração de 0.05mg/ml de NPF's mostra resultado de aumento de viabilidade celular quando comparados as concentrações de 0.15 e 0.20 µg/mL para um período de 72h. E que de acordo com os tipos de funcionalizações pode-se otimizar todo o processo para garantir um melhor resultado e consequentemente um menor índice de toxicidade desses nanomateriais.

Outro fato observado é que todas as amostras se apresentaram com níveis baixos de toxicidade quando comparadas ao controle negativo.

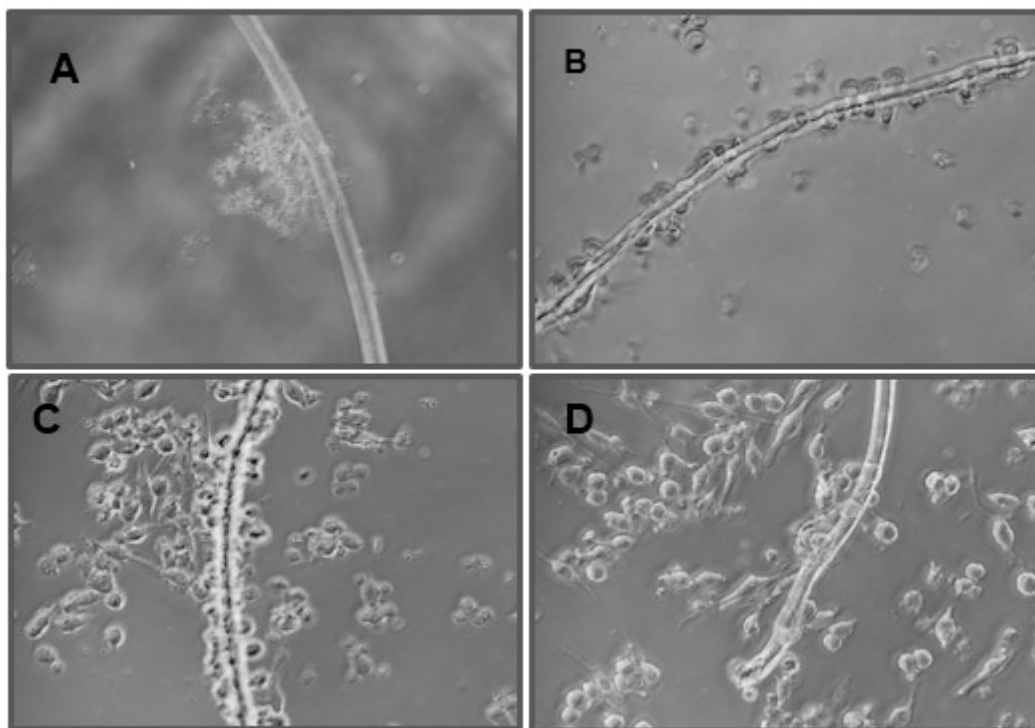
Os estudos realizados indicam resultados prévios que as NPF's usados na pesquisa têm potencial chances de serem utilizados para incorporar biomateriais e/ou regeneração celular, no entanto será necessário mais estudos e análises para que os resultados possam apontar algumas evidencias que não foram realizadas e observadas neste trabalho.

5.9 Ensaio de Adesão Celular

Os ensaios de adesão celular com células RAW (macrófagos) foram realizados com o objetivo de avaliar a adesão/interação das células com as NPF's na forma funcionalizados com quitosana (0.01/mL).

A Figura 40 mostra a interação de células RAW com o PLA nas NPF copm e sem funcionalização de quitosana.

Figura 40 – Fotomicrografia da interação de células RAW com NPF's em 72h a)PLA; b)PLANPF; c)PLAQNPF d)PLAQ, respectivamente. Aumento de 400x



Fonte: AUTOR, 2017.

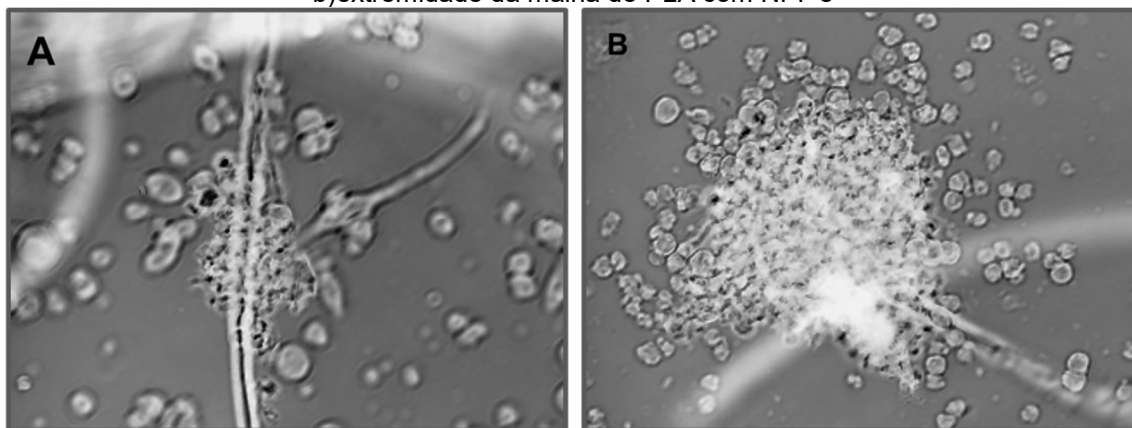
Analisando a sequência das fotomicrografia após 72h podemos observar que na Figura 40 a) a malha de PLA alvejada é tóxica às células, pois as células RAW aparecem mortas em contato com a malha.

A sequência 40 (b) corresponde às células interagindo com o PLA carregados de NPF's, analisando a fotomicrografia podemos visualizar que as células se aderem a malha revestida com NPF's havendo pouca morte celular. A sequência 40 (c) corresponde às amostras de PLA funcionalizadas com quitosana e NPF's, onde as células atacam a malha em maior quantidade havendo poucas mortes celulares. Na sequência 40 (d), às amostras de PLA funcionalizadas somente com quitosana também apresentaram pouca morte celular e boa interação com as células RAW.

Um fato interessante das interações das células RAW ocorreu na diferença de degradação das células no meio da malha de PLA em relação às extremidades da malha. Podemos observar na figura 41 que nas extremidades há mais morte das células RAW, pois provavelmente não está bem revestido com as NPF's como no meio da malha de PLA onde as células resistem bem ao revestimento com as NPF's. Portanto, aparentemente a exposição do PLA somente alvejado é citotóxica às

células, com a funcionalização da malha de PLA com as NPF's em toda a superfície garante um material não citotóxico.

Figura 41 – Fotomicrografia indicando efeito diferente a) meio da malha de PLA com NPF's
b)extremidade da malha de PLA com NPF's



Fonte: AUTOR, 2017.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos na realização do trabalho experimental, é possível inferir as seguintes conclusões:

Os recentes avanços tecnológicos, aliados ao desenvolvimento científico, propiciaram o surgimento de novos métodos para a síntese controlada de nanopartículas bem como a busca de materiais inteligentes que possam conferir novas funcionalidades ao material têxtil médico. Dentro da imensa gama de materiais que estão sendo testados, os biomateriais têm recebido uma maior atenção, afinal, sua capacidade de não gerar elementos tóxicos é de fundamental importância na aplicação biológica.

Seguindo o interesse mundial, nosso trabalho teve como objetivo a produção de nanopartículas de fibroína, uma macromolécula proteica presente no casulo do bicho da seda que por apresentar características como: biocompatibilidade e biodegradabilidade é considerada um material promissor na produção de novos carreadores farmacológicos.

O resultado DLS e FTIR comprovam a formação das nanopartículas de fibroína de seda com tamanhos médios entre 48 a 156 nm, e potencial zeta de $-19,95\Omega$, como também os resultados de BET e MET mostra nanopartículas uniformes e esféricas com tamanho médio de diâmetro $0,22\ \mu\text{m}$ O que caracteriza um ótimo material uniforme, denso e esférico.

A modificação das nanopartículas com a quitosana ajudaram na impregnação da malha para uma melhor adesão e consistência da impregnação das NPF's na malha de PLA.

Avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT mostra uma nanopartícula para concentrações mínimas 0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL não apresentaram índice de citotoxicidade. Já nas concentrações de 0,15mg/mL e 0,2mg/mL apresenta um pequeno índice de citotoxicidade.

As caracterizações feitas forneceram base para confirmar que o método de obtenção das nanopartículas por sistema ternário é uma alternativa eficaz e de custo baixo onde apresenta um grande potencial das nanopartículas de fibroína para como biomaterial, devido à sua, biocompatibilidade e biodegradabilidade.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, Teimouri; MOHAMMAD, Azadi; RAHMATOLLAH, Emadi; JALIL, Lari; ALIREZA, Najafi Chermahini. **Preparation, characterization, degradation and biocompatibility of different silk fibroin based composite scaffolds prepared by freeze-drying method for tissue engineering application**, *Polymer Degradation and Stability*, Volume 121, 2015, Pages 18-29.

ABDI. **Nanotecnologias**: Subsídios para a problemática dos riscos e regulamentação., s.l.: Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. 2011.

ALBANESE, Alexandre; TANG, Peter S.; CHAN, Warren CW. **The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems**. *Annual review of biomedical engineering*, v. 14, p. 1-16, 2012.

ALMEIDA, Suelen. **Pirólise rápida da casca de arroz: estudo de parâmetros e caracterização de produtos**. Tese de Mestrado, UFRS, Porto Alegre, 2010.

ALVES, G. J. S. & RUTHSCHILLING, E. A. **Vestuário convencional: Aplicação e comercialização de eco-têxteis**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

ALVES, O. L. **Nanotecnologia, nanociência e nanomateriais: Quando a distância entre presente e futuro não é apenas questão de tempo.**, Campinas: Parcerias Estratégicas. 2004.

AMAND, Subhash C., **Handbook of Technical Textiles**. Pp. 559 Woodhead Publishing, Inglaterra. 2000.

ARAKI, Koiti. **Estratégia Supramolecular para a nanotecnologia**. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 6, 1484-1490, São Paulo, Brasil, 2007.

ARAÚJO, Mário de; FANGUEIRO, Raul e HONG, Hu, **Têxteis Técnicos**; Vol. 3, junho de 2001.

BECCENERI, Amanda Blaque - Adesão Celular. Disponível: <http://www.laben.ufscar.br/metodos-utilizados/adesao-celular>. Acessada 23 de novembro de 2017.

BERG, J. Michael *et al.*, **The relationship between pH and zeta potential of~ 30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to in vitro toxicological evaluations**. *Nanotoxicology*, v. 3, n. 4, p. 276-283, 2009.

BRUNO, M.; Palummo, M.; Ossicini, S.; Del Sole, R.; *Surf. Sci.* 2007, 601, 2707. **International Conference on NANO-Structures Self-Assembling. Surface Science**. Volume 601, Issue 13, Pages 2549-2886. 2007.

CANDICE, Felippi. Disponível em <https://betaeq.com.br/index.php/2015/09/29/a-origem-da-nanotecnologia-e-suas-varias-aplicacoes/> Acesso dia 23 de novembro de 2017.

CAO, Ting-Ting; ZHOU, Zhen-Zhen; ZHANG, Yu-Qing. **Processing of β -Glucosidase–Silk Fibroin Nanoparticle Bioconjugates and Their Characteristics.** *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 173, n. 2, p. 544-551, 2014.

CARRETERO, Agatha Cristine. **Desenvolvimento de fibras têxteis à base de polímeros naturais para aplicações médicas.** *Dissertação* (mestrado em ciências) – Programa de Pós-Graduação em Têxtil e Moda; Escola de Artes, Ciências e Humanidade da Universidade de São Paulo, 2013.

CHOUDHURY, Arup Jyoti *et al.* **Controlled antibiotic-releasing *Antheraea assama* silk fibroin suture for infection prevention and fast wound healing.** *Surgey*, v. 159, n. 2, p. 539-547, 2016.

EUFINGER, K., **Incorporation of Nanotechnology in Textile Applications**, 22 set. 2009. Disponível em: < <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=2402>>. Acessado em 30 jul. 2017.

FALCETTA, E. J. **Novos fios sintéticos biodegradáveis.** In: XXI Congresso Nacional De Técnicos Têxteis – II Simposio Internacional De Engenharia Têxtil, 1-13p. 2004. Natal.Brasil. Anais ... 2004. 1CD.

FERREIRA, Alexandre José Sousa; NUNES FERREIRA, Fernando Batista; OLIVEIRA, Fernando Ribeiro. **Têxteis Inteligentes–Uma breve revisão da literatura.** *REDIGE* v. 5, n. 01, 2014.

GIRI V.R. Dev, J. Venugopal, S. Sudha, G. Deepika, S. Ramakrishna, **Dyeing and antimicrobial characteristics of chitosan treated wool fabrics with henna dye,** *Carbohydrate Polymers*, 75: 646-650. 2009.

Koh, Leng-Duei *et al.*, **Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials.** 2015.

KUNDU, Subhas C. *et al.*, **Natural protective glue protein, sericin bioengineered by silkworms: potential for biomedical and biotechnological applications.** *Progress in Polymer Science*, v. 33, n. 10, p. 998-1012, 2008.

LADCHUMANANANDASIVAM, R. *Apostila - Ciência dos Polímeros e Engenharia de Fibras II*, p.5-9, 2006.

LOPES, Josias Rogério, **Síntese de nanopartículas de prata (NPsAg) em soluções aquosas de fibroína de seda e gelatina** – Campinas, SP: [s.n], 2017

LOZANO-PÉREZ, A. Abel *et al.* **Antitumor properties of platinum (IV) prodrug-loaded silk fibroin nanoparticles.** *Dalton Transactions*, v. 44, n. 30, p. 13513-13521, 2015.

LOZANO-PÉREZ, Antonio Abel *et al.* **Silk fibroin nanoparticles constitute a vector for controlled release of resveratrol in an experimental model of inflammatory bowel disease in rats.** *International journal of nanomedicine*, v. 9, p. 4507, 2014.

MALLMANN, Eduardo José Jucá; Obtenção de um novo compósito biológico com prioridades magnéticas. Fortaleza, 2010. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Fortaleza. Centro de Ciências, Depto. De física analítica e físico-química, Fortaleza.

MARTINEZ, Maria Elisa Marciano *et al.* **Avaliação do perfil patentário do emprego de nanotecnologias no setor têxtil.** Cadernos de Prospecção, v. 5, n. 4, p. 185, 2014.

MATHUR, Anshu B.; GUPTA, Vishal. **Silk fibroin-derived nanoparticles for biomedical applications.** *Nanomedicine*, v. 5, n. 5, p. 807-820, 2010.

MELO, Tristana Veras de. **Têxteis Orgânicos - Nova Moda.** Dissertação de Mestrado em Engenharia Têxtil, Área de Especialização Design e Marketing. Universidade do Minho Escola de Engenharia. Set. 2009. Disponível: <https://www.yumpu.com/pt/document/view/12721992/nova-modapdf-universidade-do-minho>.

MONDAL, M., TRIVEDI, K. KUMAR, N. **The silk proteins, serici and fibroin in silkworm, Bombyx mori Linn., - a review.** Caspian Journal of Environmental Sciences, v. 5, n. 2, p.63–76, 2007.

NAM, Jin; PARK, Young Hwan. **Morphology of regenerated silk fibroin: Effects of freezing temperature, alcohol addition, and molecular weight.** Journal of Applied Polymer Science, v. 81, n. 12, p. 3008-3021, 2001.

PARK J, Joo J, Kwon SG, Jang Y, Hyeon T. **Synthesis of monodisperse spherical nanocrystals.** Angew Chem Int Ed Engl.;46(25):4630-60. 2007.

PEREZ, J., Nanotecnologia: **A manipulação do invisível.** s.l.:Centro Ecológico.2009.

RAMOS, Delfina Gabriela Garrido. **Têxteis cirúrgicos reutilizáveis e seu impacto ambiental.** Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho. Guimarães, 2003.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **An Introduction to Materials in Medicine.** Elsevier: Oxford, cap. Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor. 2013.

RITA, Rabelo; GUISE, Catarina; ROSADO, Katherine; FANGUEIRO, Raul. **Aplicações de Materiais Fibrosos na Área Médica.** International Conference on Engineering UBI2011 Innovation & Development. Centro de Ciência e Tecnologia Têxtil, Universidade do Minho, Guimarães,Portugal, 2011.

ROCO, M. C.; BAINBRIDGE, W. (Ed.). **Societal implications of nanoscience and nanotechnology.** [S. l.]: National Science Foundation, 2001. Acessado em: 12 de nov. 2017.

RODRIGUEZ-NOGALES, A. *et al.* Effect of aqueous and particulate silk fibroin in a rat model of experimental colitis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511, n. 1, p. 1-9, 2016.

SÁ, Daniela Pereira. **Desenvolvimento de um novo tratamento anti-bacteriano para bio-funcionalização de materiais à base de lã**. Dissertação de mestrado em bioquímica. Universidade Beira Interior. 2009.

SEIB, F. Philipp *et al.* **-Dependent Anticancer Drug Release from Silk Nanoparticles**. Advanced healthcare materials, v. 2, n. 12, p. 1606-1611, 2013.

SHARMA, Shaily *et al.* **Silk fibroin nanoparticles support in vitro sustained antibiotic release and osteogenesis on titanium surface**. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, v. 12, n. 5, p. 1193-1204, 2016.

SILVA, Iris Oliveira da. **Síntese e imobilização de nanopartículas de ouro em fibras regeneradas via exaustão para potencial aplicação biomédica** - Natal, RN, 2014. 79 f.: il.

SUBIA, B. e KUNDU, S. C., 2013. **Drug loading and release on tumor cells using silk fibroin-albumin nanoparticles as carriers**. Nanotechnology 24 p.1-11 2013.

TAVARES, Idylla Siva; **Obtenção e caracterização de nanopartículas de quitosana**. Natal/RN, 2011. Dissertação (mestrado em Química) Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de ciências exatas e da terra. Programa de Pós-Graduação em Química.

TEIXEIRA, Viviane Gomes; COUTINHO, Fernanda M. B.; GOMES, Ailton S. **Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno**. Quím. Nova, São Paulo , v. 24, n. 6, p. 808-818, Dec. 2001. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422001000600019&lng=en&nrm=iso>. access on 06 Feb. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422001000600019>.

TIAGO, PAULO, JOÃO, BÁRBARA, **Nanotecnologia?** 10 fev. 2009. Disponível em: < <http://nanotecnologiananotecnologia.blogspot.com/>>. Acessado em 10 nov.2017.

TOMA, H. E., 2004. **O Mundo Nanométrico: A Dimensão do Novo Século**. 2ª ed. s.l.:Oficina de Textos.

TORRES, Mariana Rigo, RAMOS, Júlia Baruque, **Nanotecnologia Aplicada À Indústria Têxtil**. Universidade de São Paulo, Escola de Artes, Ciências e Humanidades. SIICUSP – 22º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP.2014.

VALLE, M. C. G. *et al.* **Uma nova geração de fibras: Um estudo sobre a busca pelo conforto e redução dos impactos ambientais**. Rev. Univ. Rural, Sér. Ciências Humanas. Seropédica, RJ, EDUR, v. 26, n. 1-2, jan. – dezembro 2004. p. 60-66.

VALLES RAMIREZ, Silvia Marisol, 1987- V242a Val **Avaliação dos efeitos da idade da fibroína de seda nas suas propriedades durante o processamento**. – Campinas, SP: [s.n.], 2016.

WANG, Zheng *et al.*, **A neuroprotective sericin hydrogel as an effective neuronal cell carrier for the repair of ischemic stroke.** *ACS applied materials & interfaces*. v. 7, n. 44, p. 24629-24640, 2015.

www.dailysoleil.com/global-europe-medical-textiles-market-2018-world-analysis-forecast-2022/, acesso em novembro 2017.

www.fibre-maxmodel.com/, acesso em novembro 2017.

ZANONI, Elton. Disponível -
<https://nanomateriais.wordpress.com/2016/08/06/nanotecnologia-em-tecidos/> Acesso em 23 de novembro de 2017.

ZHANG, Yu-Qing *et al.* **Formation of silk fibroin nanoparticles in water-miscible organic solvent and their characterization.** *Journal of Nanoparticle Research*, v. 9, n. 5, p. 885-900, 2007.